

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ESTUDO DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFEÇÃO POR *ANAPLASMA* SPP.,
EHRlichia SPP., *BABESIA* SPP., *LEISHMANIA* SPP. E *DIROFILARIA* SPP. EM CÃES DO
ALENTEJO NORTE - PORTUGAL

RITA ISABEL PIRES CANHOTO

ORIENTADOR:

Dr. José Carlos Costa Pinto de Matos Cortes

COORIENTADOR:

Mestre Telmo Renato Landeiro Raposo Pina
Nunes

2020

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



ESTUDO DOS FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À INFEÇÃO POR *ANAPLASMA* SPP.,
EHRLICHIA SPP., *BABESIA* SPP., *LEISHMANIA* SPP. E *DIROFILARIA* SPP. EM CÃES DO
ALENTEJO NORTE - PORTUGAL

RITA ISABEL PIRES CANHOTO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Professora Doutora Isabel Maria Soares
Pereira da Fonseca de
Sampaio

ORIENTADOR:

Dr. José Carlos Costa Pinto de Matos Cortes

COORIENTADOR:

Mestre Telmo Renato Landeiro Raposo Pina
Nunes

VOGAIS:

Professor Doutor José Augusto Farraia e
Silva Meireles
Dr. José Carlos Costa Pinto de Matos Cortes

2020

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA TESE OU DISSERTAÇÃO

Nome: Rita Isabel Pires Canhoto

Título da Tese ou Dissertação: Estudo dos fatores de risco associados à infeção por *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp. e *Dirofilaria* spp. em cães do Alentejo Norte – Portugal

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

☐ Clínica

☐ Produção Animal e Segurança Alimentar

☐ Morfologia e Função

☒ Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☐ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;

2. ☒ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☒ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Utilização dos dados e conclusões obtidos na dissertação para publicação de um artigo científico
--

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações:

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 05 de Junho de 2020,

Assinatura:

Rita Canhoto

*Às minhas queridas tia Manuela e tia Vivi
Com certeza, as pessoas mais felizes e
orgulhosas no dia em que me torno
Médica Veterinária.*

“«Ama e faz o que quiseses». (...) É que quem ama, só pode fazer o bem. E querer o bem é muito exigente. Não é «ama e faz o que te apetece», o que seria uma contradição. É antes: «Se amares de verdade, vais saber escolher o bem e o melhor.»”

Vasco Pinto de Magalhães s.j., in “Não há soluções, há caminhos

Agradecimentos

Naquela que foi, até hoje, a mais longa e dura jornada, não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que, de alguma maneira, caminharam comigo e me ajudaram a torná-la possível.

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, Dr. José Carlos Cortes. Agradecer por acreditar e confiar em mim, tantas vezes mais que eu própria. Pelo seu aconselhamento e orientação determinantes em vários momentos. Pelo desafio e oportunidade gigante que me ofereceu e por me ter formado, verdadeiramente, como Médica Veterinária, muito para lá da prática clínica.

Deixo, igualmente, um sincero e enorme obrigado ao professor Telmo Pina Nunes. Pela porta aberta do seu gabinete, a todos os estudantes, em todas as alturas. Pela amabilidade com que nos recebe e ouve. Por ter aceitado, desde o primeiro momento, trabalhar comigo. A sua dedicação ao ensino e investigação e, sobretudo, a forma humana como o faz são uma verdadeira inspiração.

Ao professor Helder Cortes. Obrigada por ter aceitado embarcar nesta aventura. Pela disponibilidade e dedicação com que conduziu todo o estudo, ainda que num período de menor serenidade. O seu contributo foi fundamental na realização desta dissertação.

À Dra. Maria João Vila-Viçosa do laboratório de parasitologia Victor Caeiro, Universidade de Évora. Pelo apoio imensurável na realização de todas as técnicas laboratoriais, pelo conhecimento transmitido, mas sobretudo, pela entrega e paixão diárias que transparecem em todas as suas ações. Foi um verdadeiro prazer cruzar o seu caminho e ter partilhado este período consigo. Guardarei as nossas conversas para sempre.

À bonita equipa do Centro Veterinário de Estremoz e Vila Viçosa. Pelo carinho com que me receberam desde o primeiro dia. Pelo apoio permanente, pela confiança e por tanta, tanta, tanta aprendizagem transmitida. São incríveis e merecem o meu destaque: as minhas queridas enfermeiras – Catarina, Filipa e Patrícia – e as minhas queridas médicas – Dra. Ana e Dra. Salomé. Muito daquilo que sou, enquanto Médica Veterinária, vos devo.

Não podia deixar de realçar a Dra. Salomé Dias Lagoa. Pela brilhante e dedicada Médica Veterinária que é. Não poderei nunca agradecer verdadeiramente e/ou retribuir a disponibilidade incondicional daquela que foi, verdadeiramente, a minha mestre. O seu apoio e carinho foram e são fundamentais. Todos ficamos mais felizes e tranquilos com a sua presença, inclusive os nossos pacientes. Quero, um dia, ser um bocadinho daquilo que a Dra. Salomé é.

A toda a comunidade da Faculdade de Medicina Veterinária – docentes, alunos e funcionários. Todos, de alguma forma, contribuíram para aquilo que sou hoje. Não poderia estar mais grata por completar a minha formação nesta instituição, rodeada de pessoas

maravilhosas e competentes. O caminho nem sempre foi fácil mas foi, definitivamente, muito feliz.

Aos meus colegas que viraram verdadeiros amigos: Alexandre, Ana, Beatriz, Cláudia, Chiquinha, Eloy, Margarida, Marta, Nídia, Sara, Serra, Sofia, Pilar, Tó Jó, Oliveira e Vinhas. Foi muito, muito bom. E, se assim foi, foi em grande parte por poder dividir convosco o desespero das épocas de exames intermináveis, mas, sobretudo, pela alegria, amizade e companheirismo que caracterizaram todos os momentos que vivemos juntos e que tornaram os anos de faculdade, de facto, os melhores anos da nossa vida.

À minha querida Beatriz, a irmã que encontrei no primeiro momento que entrei na FMV. Estava destinado, amiga minha. É para a vida. Obrigada pela amizade e lealdade. Obrigada, sobretudo, pelo nosso ano a leste e pela partilha de lágrimas – aquelas que caíam durante as gargalhadas infundáveis, mas também as que caíram em momentos menos felizes. Ocupas um lugar muito bonito no meu coração e sei que não mais pararemos de fazer memórias juntas.

Às minhas queridas Rititi e Sofia, aquelas que são o meu porto seguro em todas as etapas. É mesmo de sempre e para sempre. Obrigada por terem sempre o conselho certo, o abraço apertado, e a gargalhada que serve de fundo a todos os momentos da nossa vida.

À minha querida Inês, aquela que foi a minha quarta orientadora nesta dissertação. Agradeço, sobretudo, a sua lealdade, paciência e racionalidade impressionantes. Por ser sempre minha amiga e por ter sempre um conselho sincero. Por me receber e ouvir, sem julgamentos, quando estou perdida. Por partilhar comigo a sua inteligência e sentido de humor. Mas, acima de tudo, pelo exemplo de perseverança e luta, mostrando-me que nunca se desiste dos nossos ideais e sonhos.

À Missão País e a todas as pessoas que dela fizeram parte. Que projeto incrível! Que alegria ter-vos conhecido e ter crescido convosco.

Por fim, o agradecimento mais importante: à minha família, o meu verdadeiro pilar e fonte de amor e apoio incondicionais. Aos meus pais, sobretudo, por me terem permitido chegar até aqui. Obrigada por me oferecerem o vosso colo, sempre. Obrigada pelo exemplo de carinho e dedicação que são. Obrigada por me aconselharem, respeitando sempre a minha opinião e vontade. É um privilégio ser vossa filha e ter sido educada por vocês. Devo-vos tudo o que sou.

Estudo dos fatores de risco associados à infeção por *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp. e *Dirofilaria* spp. em cães do Alentejo Norte – Portugal

Resumo

As doenças transmitidas por vetores (DTV) são provocadas por vírus, bactérias ou parasitas transmitidos através da fixação ou picada de um artrópode hematófago, sendo as carraças, flebótomos e mosquitos os vetores mais frequentes. São uma preocupação crescente pela sua atual tendência emergente, sendo que o seu carácter zoonótico as coloca como um assunto de *One Health*. Frequentemente sem manifestações clínicas ou revelando um quadro clínico abrangente e inespecífico, o diagnóstico de infeções por estes agentes é um verdadeiro desafio, prevendo-se que a prevalência destes agentes esteja, muitas vezes, subdiagnosticada. No entanto, esta deteção é fundamental, pois, se por um lado os cães doentes necessitam correto diagnóstico e tratamento, por outro, os cães sem sinais clínicos atuam como sentinelas e hospedeiros reservatório destes agentes, perpetuando a sua transmissão para outros animais e para o Homem.

O presente estudo foi elaborado com o objetivo de diagnosticar a prevalência de *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Leishmania infantum* e *Dirofilaria immitis* em 102 cães que habitam na região interior norte do Alentejo, determinando quais os fatores de risco associados à infeção por cada um destes agentes.

Na observação dos esfregaços sanguíneos não foi possível identificar nenhum destes agentes (0%). Na análise sorológica, através de ELISA, foi diagnosticada uma seroprevalência de *A. phagocytophilum* de 0% (0/102), uma seroprevalência de *E. canis* de 22,9% (24/102), uma seroprevalência de *L. infantum* de 33,7% (35/102) e uma seroprevalência de *D. immitis* de 0,98% (1/102). Através de IFI, foi diagnosticada uma seroprevalência de *B. canis* de 26,5% (27/102).

Foram ainda analisados diversos fatores (características individuais, hábitos de vida e profilaxia dos cães amostrados), estudando a sua influência na ocorrência de infeção por cada um destes agentes. Foi determinada uma associação estatística significativa entre animais séniores e animais de raça indefinida e a positividade a *E. canis*; entre animais séniores e a positividade a *B. canis*; e, por fim, entre animais de criação, animais com acesso permanente ao exterior e animais que utilizam produtos com ação contra os mosquitos/flebótomos e a positividade a *L. infantum*.

Palavras-chave: CVBD; seroprevalência; fatores de risco; saúde pública; Alentejo - Portugal

Study of risk factors associated with infection of *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp. and *Dirofilaria* spp. in dogs from the North Alentejo – Portugal

Abstract

Vector-borne diseases (VBD) are caused by viruses, bacteria or parasites transmitted by an hematophagous arthropod. Ticks and mosquitoes are the most frequent vectors of pathogens. These diseases are in growing concern for their current emerging trend, and their zoonotic trend makes them a One Health topic. Often in asymptomatic cases or, with a nonspecific clinical picture, the diagnosis of the infections agents is a real challenge, and it is expected that the prevalence rate of these agents is often underestimated. However, this detection is essential, in order to achieve the correct diagnosis and treatment to diseased animals, knowing that asymptomatic dogs act as sentinels and reservoir hosts for these agents, spreading their infection to other animals and to humans.

In the present study we studied the prevalence rate of *A. phagocytophilum*, *E. canis*, *B. canis*, *L. infantum* and *D. immitis* in 102 dogs that live in North Alentejo, identifying risk factors associated with the infection of these agents.

In the observation of blood smears, it was not possible to identify any of these agents (0%). In the serological analysis, by ELISA, *A. phagocytophilum* seroprevalence was 0% (0/102), *E. canis* seroprevalence was 22,9% (24/102) and *D. immitis* seroprevalence was 0,98% (1/102). By IFI, *B. canis* seroprevalence was 26.5% (27/102) and *L. infantum* seroprevalence was 33,7% using ELISA (35/102).

Several factors were also analyzed (individual characteristics, life habits and prophylaxy routine), studying their influence on the occurrence of infection by each of these agents. A statistically significant association was found between senior animals and animals of non-defined breed and positivity to *E. canis*; between senior animals and positivity to *B. canis*; between breeding animals, animals with permanent outdoor lifestyle and animals that use products with action against mosquitoes/sandflies and positivity to *L. infantum*.

Keywords: CVBD; seroprevalence; risk factors; public health; Alentejo – Portugal

Índice

Índice de figuras	xi
Índice de gráficos.....	xii
Índice de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas	xiv
1. Relatório de atividades desenvolvidas durante o estágio curricular	1
2. Introdução	3
3. Revisão bibliográfica.....	5
3.1. <i>Anaplasma</i> spp.	5
3.1.1. Ciclo de vida.....	5
3.1.2. Vetores e hospedeiros.....	5
3.1.3. Distribuição geográfica e prevalência em Portugal.....	6
3.1.4. Patogénese	7
3.1.5. Predisposição.....	7
3.1.6. Saúde Pública	7
3.2. <i>Ehrlichia</i> spp.	8
3.2.1. Ciclo de vida.....	9
3.2.2. Vetores e hospedeiros.....	9
3.2.3. Distribuição geográfica e prevalência em Portugal.....	10
3.2.4. Patogénese	11
3.2.5. Predisposição.....	11
3.2.6. Saúde Pública	12
3.3. <i>Babesia</i> spp.....	12
3.3.1. Ciclo de vida.....	13
3.3.2. Vetores e hospedeiros.....	14
3.3.3. Distribuição geográfica e prevalência em Portugal.....	15
3.3.4. Patogénese	16
3.3.5. Predisposição.....	16
3.3.6. Vacinação	17
3.3.7. Saúde pública	17
3.4. Sinais clínicos, diagnóstico, tratamento e prevenção das doenças transmitidas por artrópodes.....	18
3.5. <i>Leishmania</i> spp.....	20
3.5.1. Ciclo de vida.....	20
3.5.2. Vetores e hospedeiros.....	21

3.5.3. Distribuição geográfica e prevalência em Portugal.....	22
3.5.4. Patogénese	23
3.5.5. Predisposição.....	24
3.5.6. Vacina	24
3.5.7. Saúde pública	25
3.6. <i>Dirofilaria</i> spp.	26
3.6.1. Ciclo de vida.....	26
3.6.2. Vetores e hospedeiros.....	27
3.6.3. Distribuição geográfica e prevalência em Portugal.....	28
3.6.4. Patogénese	29
3.6.5. Predisposição.....	29
3.6.6. Saúde pública	29
3.7. Sinais clínicos, diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças transmitidas por flebótomos/mosquitos.....	30
4. Estudo dos fatores de risco associados à infeção por <i>Anaplasma</i> spp., <i>Ehrlichia</i> spp., <i>Babesia</i> spp, <i>Leishmania</i> spp. e <i>Dirofilaria</i> spp. em cães do Alentejo norte – Portugal.....	33
4.1. Objetivos	33
4.2. Materiais e métodos	33
4.2.1. Caracterização geográfica e climática da área de estudo	33
4.2.2. Caracterização da população em estudo	35
4.2.3. Colheita das amostras e processamento	38
4.2.4. Métodos laboratoriais	38
4.2.5. Inquéritos	42
4.2.6. Análise estatística	43
4.3. Resultados	44
4.3.1. Resultados laboratoriais.....	44
4.3.2. Inquéritos	45
4.3.3. Análise espacial	46
4.3.4. Fatores de risco	51
4.3.5. Concordância testes rápidos VS análise laboratorial	55
5. Discussão	56
6. Conclusão	68
Bibliografia.....	69
Anexos	76

Índice de figuras

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>B. canis</i>	14
Figura 2 - Ciclo de vida de <i>L. infantum</i>	21
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>D. immitis</i>	27
Figura 4 – Área de estudo do trabalho experimental.	34
Figura 5 - Localização dos artrópodes encontrados no exame físico de cinco animais incluídos no estudo.....	46
Figura 6 – Distribuição geográfica dos cães considerados duvidosos e negativos na análise sorológica de <i>A. phagocytophilum</i>	47
Figura 7 - Distribuição geográfica dos cães considerados positivos e negativos na análise sorológica de <i>E.canis</i>	48
Figura 8 – Distribuição geográfica dos cães considerados positivos e negativos na análise sorológica de <i>B.canis</i>	49
Figura 9 - Distribuição geográfica dos cães considerados positivos e negativos na análise sorológica de <i>L.infantum</i>	50
Figura 10 - Distribuição geográfica dos cães considerados positivos e negativos na análise sorológica de <i>D. immitis</i>	51

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Evolução da temperatura e precipitação médias diárias no distrito de Évora durante o período em que decorreu o estudo	35
Gráfico 2 - Evolução da temperatura e precipitação médias diárias no distrito de Portalegre durante o período em que decorreu o estudo	35
Gráfico 3 - Frequência relativa (%) da distribuição de sexo dos cães incluídos na amostra.....	36
Gráfico 4 - Frequência relativa (%) da distribuição de idade dos cães incluídos na amostra.	36
Gráfico 5 - Frequência relativa (%) da distribuição de raça dos cães incluídos na amostra.	37
Gráfico 6 - Frequência relativa (%) da distribuição do comprimento do pêlo dos cães incluídos na amostra.	37

Índice de tabelas

Tabela 1 – Principais aspetos do quadro clínico, diagnóstico, tratamento e prevenção das doenças transmitidas por artrópodes	19
Tabela 2 - Principais aspetos do quadro clínico, diagnóstico, tratamento e prevenção das doenças transmitidas por flebótomos/mosquitos	31
Tabela 3 - Prevalência dos hemoparasitas em estudo, calculada segundo os limites de Blaker	45
Tabela 4 - Resultados do modelo de regressão logística de <i>E.canis</i>	52
Tabela 5 - Resultados do modelo de regressão logística de <i>B.canis</i>	53
Tabela 6 - Resultados do modelo de regressão logística de <i>L. infantum</i>	54
Tabela 7 - Fatores de risco associados à seroprevalência de <i>E. canis</i> , <i>B. canis</i> e <i>L. infantum</i>	54
Tabela 8 - Resultados dos diferentes testes de diagnóstico realizados para cada agente	55
Tabela 9 - Resultados da análise de concordância entre ELISA (laboratório) e a técnica de imunocromatografia (teste rápido) de <i>E.canis</i>	56
Tabela 10 - Resultados da análise de concordância entre ELISA (laboratório) e a técnica de imunocromatografia (teste rápido) de <i>L. infantum</i>	56

Lista de abreviaturas

< - Menor que
> - Maior que
® - Marca registrada
°C – Graus Celcius
µL – Microlitro
µm – Micrómetro
µg – Micrograma
ALP - Fosfatase alcalina
ALT - Alanina transaminase
AMS – Sociedade Americana de Dirofilariose (do inglês American Heartworm Society)
BID – Administração a cada doze horas (do latim *bis in die*)
CVEVV – Centro Veterinário de Estremoz e Vila Viçosa
DTV – Doenças transmitidas por vetores
DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic acid)
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid)
ELISA – Ensaio imunoenzimático (do inglês Enzyme-linked immunosorbent assay)
ESCCAP - Conselho Científico Europeu para os Parasitas dos Animais de Companhia (do inglês European Scientific Counsel Companion Animal Parasites)
EUA – Estados Unidos da América
FDA – do inglês Food and Drug Administration
FMV – Faculdade de Medicina Veterinária
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
H – horas
HIV – vírus da imunodeficiência humana (do inglês Human immunodeficiency virus)
HRP – enzima peroxidase de rábano (do inglês Horseradish peroxidase)
IC – Intervalo de confiança
IFI – Imunofluorescência indireta
IgG – Imunoglobulinas G
IM – Via intramuscular
IPUB – Instituto de Parasitologia da Universidade de Berna (do inglês Institute of Parasitology, University of Bern)
kg – Quilograma
L1 – Primeiro estadio larvar
L2 – Segundo estadio larvar
L3 – Terceiro estadio larvar
L4 – Quarto estadio larvar
L5 – Quinto estadio larvar
mg - Miligrama
ml – Mililitro
n – Número de animais
nm – Nanómetro
PAAF - Punção aspirativa por agulha fina
PBS - Tampão fosfato salino (do inglês Phosphate buffered saline)
PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês Polymerase chain reaction)
PO – Via oral (do latim *per os*)
rpm – Rotações por minuto
SC – Via subcutânea

SID – Administração a cada vinte e quatro horas (do latim *semel in die*)
SNC – Sistema Nervoso Central
spp. – Espécies
Th1 – T helper 1
Th2 – T helper 2
TMB – Substrato de tetrametilbenzidina
ULISBOA – Universidade de Lisboa

1. Relatório de atividades desenvolvidas durante o estágio curricular

O estágio curricular desenvolvido no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária decorreu nas instalações do Centro Veterinário de Estremoz e Vila Viçosa (CVEVV), no período entre 06 de Agosto de 2018 e 06 de Fevereiro de 2019, sob a orientação do Dr. José Carlos Cortes.

Neste período a orientanda pôde observar e participar nas várias atividades dos serviços de medicina interna, urgência e cuidados intensivos, internamento, cirurgia e imagiologia do CVEVV.

No serviço de medicina interna a orientanda teve a oportunidade de iniciar as consultas, realizando a anamnese e o exame físico de cada paciente. Após construção da lista de diagnósticos diferenciais, esta era discutida com o médico veterinário responsável, definindo, posteriormente, os exames complementares necessários e plano de tratamento para o diagnóstico mais provável. Durante a permanência nas consultas foi possível participar em vários atos médicos como colheita de sangue, colocação de catéter, administração de fármacos por diferentes vias, realização de citologias/biópsias, colheita de vários fluidos através de cistocentese, toracocentese ou abdominocentese, entre outros.

Assistiu-se a consultas de profilaxia (vacinação e desparasitação), consultas de primeira opinião nas diversas áreas de medicina interna, além de consultas de referência e segunda opinião. A participação ativa em todas estas permitiu à orientanda desenvolver um raciocínio clínico contemplando vários aspetos inerentes à prática da medicina veterinária. Além disto, foi possível trabalhar ferramentas de comunicação que permitem um discurso adequado, nas mais diversas situações, com os tutores dos animais. Um outro aspeto positivo a realçar foi o acompanhamento do mesmo caso clínico em posteriores reavaliações, o que permitiu seguir a evolução dos quadros, com as várias nuances que podem ocorrer. As especialidades mais frequentemente observadas foram a gastroenterologia, cardiologia, nefrologia e urologia, ortopedia e oncologia.

No serviço de urgências e cuidados intensivos a orientanda teve a oportunidade de assistir o médico veterinário na estabilização rápida de pacientes críticos. Foi possível praticar o acesso rápido a vias vasculares e/ou respiratórias, ressuscitação cardiopulmonar, controlo de hemorragias, monitorização cardíaca e respiratória, controlo de convulsões, entre outras. Este serviço foi determinante no desenvolvimento de um raciocínio e prática clínica rápida e consciente, com o estabelecimento de passos prioritários na recuperação de um paciente em risco de vida. Os casos que frequentemente obrigaram a atendimento urgente foram animais politraumatizados após acidentes automobilísticos, síncope, envenenamentos, convulsões e crises epiléticas.

No internamento a orientanda acompanhava o médico e enfermeiro na monitorização dos vários parâmetros clínicos dos pacientes hospitalizados, preparação e administração das várias medicações, prestação de cuidados básicos de higiene e alimentação, além da gestão de passeios. Foi, sobretudo, na ala do internamento que a orientanda teve oportunidade de praticar vários procedimentos como colocação de catéteres, colheita de sangue, monitorização de transfusões sanguíneas, colocação de algalias e sondas nasogástricas, mudança de pensos, entre outros. Também nesta ala foi possível a monitorização de pacientes críticos, acompanhando a sua evolução.

No serviço de cirurgia a orientanda tinha como funções acompanhar a enfermeira na preparação dos animais antes da entrada para o bloco operatório. Numa primeira fase eram realizadas análises pré-cirúrgicas, tricotomia e assépsia da região a ser intervencionada, além da colocação a soro e administração de medicação pré-anestésica. A orientanda auxiliava ainda na indução anestésica e colocação do tubo endotraqueal. Durante a cirurgia, a orientanda teve sempre a oportunidade de ser ajudante de cirurgião, observando de perto e, participando, em todas as cirurgias realizadas. Além destas tarefas, era também da sua competência acompanhar os animais no período pós-cirúrgico, monitorizando-os. As principais cirurgias que ocorreram no período de estágio foram, sobretudo, cirurgias eletivas – castrações e ovariectomias, mastectomias, remoção de nódulos/tumores cutâneos, resolução de *cherry eye* –, mas também algumas cirurgias de urgência – remoção de corpo estranho, resolução de torções/volvos gástricos, resolução de fraturas e cesareanas. No último mês de estágio, a orientanda pôde, inclusive, realizar castrações e ovariectomias, com o auxílio e supervisão do médico veterinário cirurgião.

No serviço de imagiologia, a orientanda pôde aprofundar os seus conhecimentos sobre os meios de diagnóstico imagiológico existentes no CVEVV – radiografia e ecografia. Eram suas funções auxiliar no correto posicionamento e contenção dos pacientes, de acordo com o exame a realizar. Após finalização do exame, a sua interpretação era discutida com o Médico Veterinário responsável.

Por ser um Centro Veterinário de menores dimensões, mas com casuística significativa, a orientanda frequentou todos os serviços em simultâneo, consoante a necessidade, não havendo um escalonamento definido em cada serviço.

Um dia por semana – quintas-feiras – durante todo o período do estágio, a orientanda dirigia-se ao laboratório de parasitologia Victor Caeiro da Universidade de Évora, onde procedia à fixação, coloração e observação de todos os esfregaços sanguíneos realizados durante a semana anterior, no CVEVV, no âmbito do estudo que serve de base a esta dissertação. Todo este processo era executado sob a orientação da Dra. Maria João Vila-Viçosa, técnica responsável do laboratório.

2. Introdução

Na lista de países europeus com mais animais de estimação, Portugal surge no décimo segundo lugar com cerca de 6,7 milhões de animais de companhia. Estima-se que 2 milhões (54%) de lares portugueses tenham, pelo menos, um animal de estimação; assumindo já maior destaque quando comparados com o número de crianças nos mesmos núcleos familiares (GFK (Gfk track.2pets) 2016).

De facto, um animal representa vários benefícios para os seus tutores. Além dos já muito anunciados benefícios na saúde física por serem um inequívoco estímulo ao exercício físico, também os benefícios no equilíbrio psicológico e social são cada vez mais estudados e conhecidos. A redução dos níveis de stress, ansiedade e da sensação de solidão ou depressão são alguns dos exemplos bem caracterizados (Smith 2012; G.K. Takashima and Day 2014; Ferreira et al. 2017). Os laços entre humanos e animais assumem, gradualmente, maior dimensão e fortalecimento nas diversas sociedades contemporâneas, sobretudo nos países desenvolvidos onde os animais ganham espaço dentro das habitações dos seus donos, em íntima relação de proximidade (Day 2011; G. Takashima and Day 2014).

No entanto, os riscos desta convivência não devem ser ignorados: a transmissão de potenciais agentes zoonóticos é um risco real que deve ser considerado (Smith 2012; Esch and Petersen 2013; Ferreira et al. 2017). O estilo de vida do animal, ambiente em que se insere, cuidados de vacinação e desparasitação, bem como o contacto com outros animais domésticos ou selvagens são alguns fatores determinantes na probabilidade de transmissão de agentes zoonóticos (Day 2011; G. Takashima and Day 2014).

As doenças transmitidas por vetores são provocadas por vírus, bactérias ou parasitas transmitidos através da fixação ou picada de um artrópode hematófago, sendo as carraças e os mosquitos os vetores mais frequentes (Baneth et al. 2012; Wikel 2018). Estas doenças têm vindo a ganhar destaque pelo aumento da sua frequência (Atkins et al. 2009; Beugnet and Marié 2009; Wikel 2018), alteração da sua localização endémica e/ou patogenicidade. Existem vários fatores que contribuem significativamente para o fenómeno (Mehlhorn 2011; Dantas-Torres and Otranto 2016; Skotarczak 2018). Por um lado, a comunidade científica está atualmente mais alerta, tendo ao dispor melhores ferramentas de diagnóstico, o que faz com que casos de doença sejam mais facilmente diagnosticados, estudados e reportados (Alvarado-Rybak et al. 2016; Dantas-Torres and Otranto 2016). As alterações climáticas e aquecimento global são, também, apontadas como um dos principais fatores que impulsiona a alteração na epidemiologia dos vetores, influenciando padrões de incidência e distribuição das infeções transmitidas por estes (Mehlhorn 2011; Alvarado-Rybak et al. 2016; André 2018; Wikel 2018; Zinsstag et al. 2018). A facilidade com que se viaja atualmente com animais de companhia, frequentemente sem controlo nas fronteiras dos países do espaço europeu, proporciona a circulação de agentes e vetores, tantas vezes de zonas endémicas para zonas

anteriormente indemnes (André 2018; Skotarczak 2018; Schäfer et al. 2019). Importam, igualmente, as alterações paisagísticas que surgem nas cidades com a criação de zonas verdes urbanas e peri-urbanas que constituem um espaço de risco acrescido pela interface comum que representam entre o Homem, animais domésticos e animais selvagens (Alvarado-Rybak et al. 2016; André 2018; Sanches et al. 2018).

Todas estas alterações socio-antropológicas facilitam o contacto e convivência simultânea de diferentes nichos ecológicos, a existência de novos ambientes favoráveis ao contacto com vetores, permitindo a dispersão geográfica de agentes patogénicos (Geurden et al. 2018; Schäfer et al. 2019), o aumento da sua taxa de multiplicação e a ampliação de possíveis hospedeiros competentes, culminando no estabelecimento de agentes e vetores em zonas anteriormente não endémicas (Alvarado-Rybak et al. 2016; Millán et al. 2016; André 2018).

Além de uma preocupação da Medicina Veterinária, estes agentes têm potencial zoonótico, sendo uma ameaça séria e real também para o Homem, motivo pelo qual este tema requer uma abordagem integrada e atenta de vários especialistas das diversas áreas da saúde (Maia, Almeida, et al. 2015; Skotarczak 2018). É neste contexto que se insere o conceito *One Health* – uma visão integrada da saúde humana, animal e ambiental, sabendo-as ligadas e dependentes (G. Takashima and Day 2014; Zinsstag et al. 2018) – e surge a oportunidade da presente dissertação de mestrado. Além das outras espécies domésticas e selvagens, o cão, particularmente presente no quotidiano da maioria dos portugueses, funciona como reservatório, hospedeiro amplificador e sentinela de muitos dos agentes patogénicos transmitidos por carraças ou mosquitos, participando de forma importante no ciclo destas doenças (Pereira et al. 2018; Skotarczak 2018).

A presente dissertação de mestrado surge, então, da necessidade de conhecer qual a prevalência de agentes transmitidos por vetores nos animais residentes em vários concelhos do distrito de Évora e Portalegre. Além disto, pretende perceber-se quais os hábitos de vida dos animais e protocolos de profilaxia adotados em relação a estes agentes, estudando a forma como influenciam a ocorrência de infeção. Por saber-se uma problemática emergente e, tendo o Alentejo condições geoclimáticas características que, à partida, favorecem o estabelecimento de algumas populações de vetores, além de um estilo de vida predominantemente rural da maioria dos animais de companhia, pensou-se que seria um tema pertinente, com resultados que poderão contribuir para um ajuste na prática clínica e profilática com que se aborda esta questão na medicina de animais de companhia na região.

Serão abordados *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp. e *Dirofilaria* spp. pela sua endemicidade no território europeu e área mediterrânica, ampla lista de vetores e hospedeiros vertebrados, sérias consequências clínicas em medicina veterinária,

mas, sobretudo, por serem considerados agentes zoonóticos emergentes na atualidade, constituindo uma séria e real ameaça à Saúde Pública.

3. Revisão bibliográfica

3.1. *Anaplasma* spp.

Anaplasma spp. são bactérias cocóides, gram-negativas, intracelulares obrigatórias, pertencentes à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, gênero *Anaplasma* (M.A. Taylor 2016). Com dimensões entre 0.3–1.0 µm de diâmetro, surgem como vacúolos no citoplasma dos granulócitos, em especial neutrófilos (Stuen et al. 2013; Jahfari et al. 2014; M.A. Taylor 2016). *Anaplasma phagocytophilum* é o agente responsável pela anaplasmoose granulocítica canina; *Anaplasma platys* é o agente causal da anaplasmoose trombocítica canina (Cardoso et al. 2012; Maia, Almeida, et al. 2015; Sainz et al. 2015). Ambos podem infectar um grande número de vertebrados, domésticos e selvagens, incluindo o Homem (Beugnet and Marié 2009; Maia, Almeida, et al. 2015), podendo ser fatais (Stuen et al. 2013). Além da sua importância em Medicina Veterinária, são preocupação crescente em Medicina Humana (Mehlhorn 2011).

3.1.1. Ciclo de vida

Quando o artrópode vetor se alimenta no hospedeiro vertebrado infectado, *Anaplasma* spp. infecta as células do seu intestino, passando a barreira epitelial e atingindo as glândulas salivares. Numa nova refeição sanguínea, o vetor inocula o agente patogénico através da libertação da sua saliva. Agora na circulação sanguínea do mamífero, este agente liga-se a várias células derivadas dos precursores de medula óssea, mais comumente neutrófilos (Santos 2007), por invaginação, formando um vacúolo. O agente sofre várias multiplicações por fissão binária, originando uma mórula. Por exocitose ou aquando da lise da célula hospedeira, o agente dissemina-se e invade novas células hospedeiras (Santos 2007; M.A. Taylor 2016). No artrópode, a transmissão do agente ocorre de forma transestadial (M.A. Taylor 2016).

3.1.2. Vetores e hospedeiros

As carrças do género *Ixodes* são os vetores de *A. phagocytophilum*. Na Europa, *Ixodes ricinus* é a principal espécie transmissora do agente, distribuindo-se por todo o continente (Stuen et al. 2013; Jahfari et al. 2014; Sainz et al. 2015; Geurden et al. 2018). As carrças da espécie *Rhipicephalus sanguineus* são os principais vetores de *A. platys* (Cardoso et al. 2012; Maia, Almeida, et al. 2015; Geurden et al. 2018). O DNA de *Anaplasma*

spp. foi identificado, em Portugal, em carraças *Rhipicephalus sanguineus*, *Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus bursa* (Pereira et al. 2018) e *Ixodes ventralis* (Santos et al. 2018).

Na Europa, os roedores e os ruminantes – selvagens e domésticos – são apontados como os principais hospedeiros reservatórios de *A. phagocytophilum* (M.A. Taylor 2016). Com um vetor com muitos hospedeiros possíveis, também a bactéria pode ser transmitida a diversas espécies vertebradas (M.A. Taylor 2016). Já foi isolada em vacas, ovelhas, cabras, cavalos, veados, roedores, cães, gatos e humanos (Stuen et al. 2013; Jahfari et al. 2014; Sainz et al. 2015). Já foi, também, isolada em javalis, raposas, guaxinim, leões, ursos, aves e répteis. No entanto, são necessários mais estudos para determinar o papel enquanto hospedeiros reservatórios, já que apesar de identificada a bactéria, existem poucos registos de casos clínicos em carnívoros selvagens. Resta esclarecer se estes animais são apenas temporariamente infetados, não desenvolvendo doença e não permitindo a replicação do organismo e sua transmissão, não constituindo, deste modo, verdadeiros hospedeiros reservatório (Stuen et al. 2013; Jahfari et al. 2014; Sainz et al. 2015; André 2018). O papel do cão enquanto hospedeiro reservatório continua também a ser discutido, não sendo claro se estes animais conseguem manter um nível de infeção crítico que permita outras carraças serem infetadas ao alimentarem-se no cão (Stuen et al. 2013). O agente também pode ser mecanicamente disperso por moscas hematófagas e de forma iatrogénica (instrumentos cirúrgicos e agulhas contaminadas, transfusões sanguíneas ou através do contacto com o sangue de animais infetados) (Little 2010; Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016). A transmissão perinatal e transplacentária está documentada em bovinos e no Homem, mas não no cão (Little 2010).

O principal hospedeiro de *A. platys* é o cão, talvez pelo facto do seu vetor (*R. sanguineus*) ter no cão o seu hospedeiro preferencial (Little 2010). Em Portugal, a raposa é apontada como o principal hospedeiro reservatório para os cães domésticos (Cardoso et al. 2015; André 2018).

3.1.3. Distribuição geográfica e prevalência em Portugal

A. phagocytophilum já foi identificado em vários países da Europa e América, além da Austrália, sendo considerado um agente de distribuição global (Stuen et al. 2013; M.A. Taylor 2016). No entanto, julga-se mais comum nos países do norte e centro da Europa com prevalências entre os 3% e os 57%, em canídeos. Ressalva-se, no entanto, que a ocorrência de possíveis reações cruzadas entre *Anaplasma* spp. podem influenciar o diagnóstico, resultando num sobrediagnóstico de *A. phagocytophilum* (Sainz et al. 2015). Além disto, existem ainda lacunas no conhecimento da epidemiologia da bactéria e biologia dos vetores (Stuen et al. 2013). *A. platys*, também de distribuição global, é frequentemente encontrado em zonas onde *E. canis* também está presente: com o mesmo vetor, co-habitam e co-infetam,

frequentemente, o mesmo animal. Na Europa, este agente foi identificado sobretudo nos países da bacia mediterrânica, incluindo Portugal (Sainz et al. 2015; Pereira et al. 2018).

Em Portugal, estima-se que a seroprevalência de *Anaplasma* spp. se situe entre 4,5% em animais sem sinais clínicos e 9,2% em animais clinicamente suspeitos (Cardoso et al. 2012; Maia, Almeida, et al. 2015). No Alentejo, a prevalência deste agente é de 3,5% em animais sem sinais clínicos, subindo para 9,6% em animais com manifestações clínicas sugestivas de DTV (Cardoso et al. 2012). No entanto, num estudo de 2007/2008 foi registada uma seroprevalência de *A. phagocytophilum* de 30,5% em canídeos autóctones do sul do país, dados bastante discrepantes em relação a estudos mais recentes (Menn et al. 2010). Em Portugal, *A. phagocytophilum* foi detetado no Homem, roedores, cães e cavalos (Cardoso et al. 2012); já *A. platys* foi detetado em cães (Cardoso et al. 2012) e raposas, com uma prevalência de, aproximadamente, 14,9% nos últimos. Esta percentagem considerável sugere um ciclo selvático de *A. platys* em Portugal, com as raposas a serem apontadas como hospedeiro reservatório para cães domésticos (Cardoso et al. 2015; André 2018).

3.1.4. Patogénese

A patogenia da infeção no cão é responsável por vasculites nas extremidades e inflamação pulmonar com danos alveolares, que podem culminar em descompensação respiratória. Quando a resposta inflamatória é exacerbada, o organismo responde de forma semelhante a um choque séptico (M.A. Taylor 2016). A deficiente fagocitose de neutrófilos infetados com o agente resulta, frequentemente, numa resposta imunitária ineficaz, dando aso ao aparecimento de infeções secundárias (M.A. Taylor 2016).

3.1.5. Predisposição

Não estão documentadas predisposições na infeção por *A. phagocytophilum* ou *A. platys*. No entanto, animais mais velhos são mais frequentemente seropositivos, facto que provavelmente se deve à oportunidade acumulada de exposição aos vetores e, consequentemente, a agentes transmitidos por estes (Sainz et al. 2015).

3.1.6. Saúde Pública

Ao contrário de *A. platys*, *A. phagocytophilum* é um agente zoonótico, considerado emergente e responsável pela anaplasmoose granulocítica humana (Baneth et al. 2012; Jahfari et al. 2014; Low et al. 2018; Santos et al. 2018). No entanto, estão já documentados casos de infeção por *A. platys* em humanos nos EUA e na Venezuela, pelo que o seu potencial zoonótico (Cardoso et al. 2015; Sainz et al. 2015; André 2018) será possivelmente revisto num futuro próximo.

Na Europa, apesar da ampla distribuição do vetor, os casos de infecção por *A. phagocytophilum* foram relatados principalmente nos países da Europa central (Santos et al. 2018), embora estejam reportados casos em Itália, França e Espanha (Santos 2007). Tal como nos animais, o agente é transmitido ao Homem pelo artrópode infetado, durante a sua alimentação, pelo que não há um aumento direto do perigo de contrair a doença na convivência com animais (Little 2010; Sainz et al. 2015). A transmissão iatrogénica está também descrita (Little 2010). A sintomatologia inicia-se 2 a 3 semanas após picada do artrópode e é semelhante a uma gripe – febre, dores de cabeça, dores musculares e/ou distúrbios gastrointestinais (Baneth et al. 2012; Jahfari et al. 2014; Sainz et al. 2015). Trombocitopénia, leucopénia, anemia e alterações nas enzimas hepáticas são, também, referidas (Mehlhorn 2011; Stuenkel et al. 2013). Embora já tenham sido identificados casos fatais no Homem, sobretudo em grupos de população imunocomprometidos, a maioria dos pacientes apresenta sinais clínicos ligeiros ou mantém-se subclínico (Little 2010; Mehlhorn 2011; Stuenkel et al. 2013). Em Portugal não está registado nenhum caso de infecção por *A. phagocytophilum* (Santos 2007).

A prevenção da infecção no Homem passa pelo uso de acaricidas e repelentes nos seus animais e no ambiente em torno das habitações; deve existir um controlo detalhado das carraças nos seus animais, removendo-as (Little 2010; Cardoso et al. 2012; Dantas-Torres and Otranto 2016; Millán et al. 2016).

Estudos futuros são necessários para determinar a verdadeira expressão que a anaplasmoze humana tem na Europa, já que pela pouca especificidade dos sintomas, fracos meios de diagnóstico e também, pelo fraco alerta dos especialistas de saúde para esta problemática, suspeita-se que a doença possa muitas vezes não ser diagnosticada, estando os casos clínicos subestimados (Mehlhorn 2011; Jahfari et al. 2014).

3.2. *Ehrlichia* spp.

Ehrlichia spp. são bactérias pertencentes à ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae, género *Ehrlichia* (M.A. Taylor 2016). São bactérias pleomórficas, cocóides, gram-negativas, intracelulares obrigatórias que parasitam leucócitos, apresentando-se sob a forma de mórulas intracitoplasmáticas. Transmitidas por ixodídeos, podem parasitar um amplo espectro de animais domésticos e selvagens, inclusive o Homem (Cohn 2003; M.A. Taylor 2016).

Existem três espécies que são considerados agentes patogénicos no cão: *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia chaffeensis*, responsáveis pela erliquiose monocítica canina e *Ehrlichia ewingii*, o agente da erliquiose granulocítica canina (M.A. Taylor 2016). *E. canis* parasita monócitos e macrófagos. É responsável por doença severa no cão, podendo culminar na sua

morte (Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016; André 2018); é, atualmente, a única *Ehrlichia* detetada nos cães da Europa (Sainz et al. 2015), sendo que em Portugal já foi detetada em artrópodes, cães (Cardoso et al. 2012; Pereira et al. 2018) e na raposa-vermelha (Cardoso et al. 2015; Pereira et al. 2018). *E. chaffeensis* parasita monócitos e macrófagos (M.A. Taylor 2016). Embora possa infetar o cão, é responsável, sobretudo, pela erliquiose monocitotrópica humana nos EUA (M.A. Taylor 2016). *E. ewingii* parasita neutrófilos e eosinófilos. Agente etiológico da erliquiose granulocítica canina, pode provocar doença em animais e pessoas (Little 2010; M.A. Taylor 2016).

3.2.1. Ciclo de vida

A transmissão de *Ehrlichia* spp. ocorre, sobretudo, através do artrópode vetor. No artrópode, a transmissão ocorre de forma transestadial (a transmissão transovárica não está descrita – larvas e ninfas infetam-se ao alimentarem-se nos hospedeiros vertebrados infetados, transmitindo o agente aquando de nova refeição sanguínea, como ninfas e adultos, respetivamente) (Little 2010; M.A. Taylor 2016). Quando o artrópode se fixa e se alimenta no hospedeiro, inocula o agente que se distribui na corrente sanguínea e linfática, invadindo os macrófagos do fígado e baço, onde se reproduz por fissão binária. Os macrófagos infetados disseminam-se para outros sistemas, dispersando a infeção. (M.A. Taylor 2016; Palacios et al. 2017)

3.2.2. Vetores e hospedeiros

Rhipicephalus sanguineus é o principal vetor de *E. canis*. A sua linhagem temperada é endémica na zona mediterrânica (Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016; Geurden et al. 2018) e a única encontrada em Portugal (Sanches et al. 2018). Esta é a espécie de carraça que mais parasita o cão em Portugal continental e distribui-se por todo o território português (Cardoso et al. 2012). *R. sanguineus* sobrevive dentro das habitações e canis, onde se mantém ativo com temperaturas amenas e um nível de humidade favorável, em íntima proximidade com o seu hospedeiro. Tal permite-lhes uma multiplicação exponencial, tornando-o um vetor muito competente (Little 2010; Sainz et al. 2015). Podendo transmitir o agente até 155 dias pós-infeção, a hibernação de inverno não impede de voltar a infetar hospedeiros na primavera seguinte (Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016). Apesar de *R. sanguineus* ser o principal vetor, já foi demonstrado que *Dermacentor variabilis* também transmite o agente (M.A. Taylor 2016; André 2018; Sanches et al. 2018). *Dermacentor marginatus* e *Ixodes canisuga* também foram sugeridos como possíveis vetores de *E. canis* (André 2018). Em Itália foi isolada *E. canis* em três pulgas, indiciando a participação deste inseto no ciclo de infeção (André 2018). O principal hospedeiro natural e reservatório de *E. canis* é o cão (Little 2010; M.A. Taylor 2016). Além do

cão, esta espécie já foi identificada noutros carnívoros selvagens como a raposa, chacal, coiotes, lobo, leão e puma (Sainz et al. 2015; André 2018). Em Barcelona foi registada uma maior prevalência de *E.canis* em raposas de zonas peri-urbanas comparada com a prevalência de cães domésticos de áreas residenciais. Também em Itália parece existir uma maior frequência de infeção em canídeos selvagens (André 2018).

E.chaffeensis é transmitida por carraças da espécie *Amblyomma americanum* e, com menor frequência, por *Dermacentor variabilis*. Tem como hospedeiros o cão, o veado e o Homem (Little 2010; M.A. Taylor 2016). Já foi, também, isolada em coiotes, raposas, lobos, pumas, leões, tigres e texugo (André 2018). O veado-da-cauda-branca, sobretudo, e possivelmente, o cão, atuam como hospedeiros reservatório (M.A. Taylor 2016; André 2018). Estudos sugerem um papel secundário de *R. sanguineus* na transmissão de *E. chaffeensis* ao cão (Little 2010).

Amblyomma americanum atua também como vetor de *E. ewingii*. No entanto, este agente já foi identificado em zonas onde *A. americanum* não é endémico, pelo que a sua transmissão também por *R. sanguineus*, *D. variabilis*, *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus* é sugerida. O principal hospedeiro é o cão (André 2018).

São muito raras as manifestações clínicas de *Ehrlichia* spp. em carnívoros selvagens. Como tal, são necessários mais estudos afirmar a sua condição de hospedeiros reservatórios destes agentes (André 2018).

A infeção por inoculação do agente, sem a intervenção do vetor, embora rara, pode acontecer de forma iatrogénica (Borin et al. 2009; Sainz et al. 2015). Os vetores de *Ehrlichia* spp. concentram o seu período de atividade nos meses mais quentes do ano, embora a infeção possa ocorrer durante todo o ano (Little 2010; Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016).

3.2.3. Distribuição geográfica e prevalência em Portugal

E. canis é endémica na bacia mediterrânica (Cardoso et al. 2012; M.A. Taylor 2016; André 2018). *E. chaffeensis* é endémica no sul dos EUA (M.A. Taylor 2016) e *E. ewingii* está documentada apenas nos EUA (Cohn 2003; Little 2010; M.A. Taylor 2016).

Em Portugal, a prevalência de *E. canis* situa-se, em média, entre os 4,1% em animais sem sinais clínicos e os 16,4% em animais com sinais clínicos (Cardoso et al. 2012; Maia, Almeida, et al. 2015). A maior prevalência de *E. canis* em animais sem sinais clínicos foi observada no Algarve, com 13,9%. Nos animais que apresentavam sinais clínicos, a maior seroprevalência foi registada no Alentejo, com 25,4%. Um estudo anterior sugere uma seroprevalência de *E. canis* de 24,8% em canídeos do sul de Portugal (Menn et al. 2010). Parece existir, portanto, uma maior prevalência de *E. canis* no sul do país (Cardoso et al. 2012; Maia, Almeida, et al. 2015), provavelmente pelas condições climáticas características

desta região propícias ao desenvolvimento e crescimento de populações de vetores. Na região do Alentejo, ainda que em animais sem manifestações clínicas, foi possível registar uma prevalência de 2,4%. No entanto, as percentagens de seroprevalência no norte do país não devem ser negligenciadas, já que os resultados demonstram que existe um perigo real de infeção para os animais que ali habitam (Cardoso et al. 2012). Conclui-se, assim, que a erliquiose canina é uma doença a ser considerada na lista de diagnósticos diferenciais da prática clínica, em todo o território português (Cardoso et al. 2012; Pereira et al. 2018).

3.2.4. Patogénese

A patogénese da doença resulta do efeito direto de *Ehrlichia* spp. e de reações imunomediadas secundárias (Harrus 2015). É comum a deteção de imunocomplexos circulantes no soro de animais infetados (M.A. Taylor 2016). A disseminação dos macrófagos infetados no organismo induz vasculites e coagulação intravascular, contribuindo para a destruição plaquetária já em curso. Leucopénia e anemia ocorrem por destruição de leucócitos e eritrócitos e pela hipoplasia medular, comum na fase crónica. Esta aplasia medular é a causa de morte mais comum nos pacientes crónicos e pensa-se que a predisposição da raça, a estirpe de *E. canis* ou a presença de co-infeções possam influenciar e ditar a ocorrência desta aplasia (M.A. Taylor 2016; Palacios et al. 2017). O baço tem um papel fulcral na patogénese de todas as doenças caninas transmitidas por vetores: os seus macrófagos filtram as células sanguíneas infetadas e retêm-nas, permitindo a persistência da infeção. A infiltração e ativação de células inflamatórias criam condições favoráveis à alteração e/ou destruição do parênquima esplénico originando lesões benignas (hiperplasia nodular linfóide) ou malignas (hemangiosarcoma) (Movilla et al. 2017).

3.2.5. Predisposição

O Pastor Alemão e o Huskie Siberiano parecem ter maior predisposição ao desenvolvimento de doença clínica por *E. canis*, com maior morbilidade e mortalidade (Little 2010; Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016). Não estão descritas, no entanto, predisposições em relação à idade ou ao sexo (Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016).

Estudos realizados com base em análises sorológicas demonstram maior positividade de infeção em machos, talvez pelos hábitos deambulantes característicos deste sexo que podem determinar uma maior exposição aos vetores. Também uma maior seropositividade foi demonstrada em cães mais velhos, facto que provalmente reflete uma probabilidade acumulada ao longo da sua vida de contacto com o vetor e, consequentemente, com o agente (Sainz et al. 2015).

3.2.6. Saúde Pública

E. chaffeensis é responsável pela erliquiose monocitotrópica humana (Cohn 2003; Little 2010; André 2018; Low et al. 2018); *E. ewingii* é responsável pela erliquiose granulocítica humana, doença severa que pode resultar numa taxa de mortalidade de 3%, caso não seja tratada (Little 2010). Há casos referidos nos EUA, sobretudo em pessoas imunocomprometidas (M.A. Taylor 2016); *E. canis* pode, ocasionalmente, originar infeção no Homem. São consideradas zoonoses emergentes (Cardoso et al. 2015; André 2018; Low et al. 2018).

Os principais sintomas assemelham-se a uma gripe, razão pela qual, se julga que os casos de doença humana estejam subestimados. Febre, mialgia, dores de cabeça e desorientação são sinais clínicos comumente observados. Tal como nos animais, a infeção é transmitida principalmente por ixodídeos, pelo que ter um animal infetado não aumenta diretamente a probabilidade de infeção. O cão atua como sentinela e hospedeiro reservatório para o Homem (Cohn 2003; Little 2010). A transmissão iatrogénica está também descrita (Little 2010).

3.3. *Babesia* spp.

A babesiose é uma doença que tem por etiologia protozoários pertencentes à ordem Piroplasmorida, família Babesiidae, género *Babesia* (M.A. Taylor 2016). São parasitas intracelulares obrigatórios, pleomórficos, que se localizam nos eritrócitos do hospedeiro (Mehlhorn 2011) e são transmitidos, essencialmente, através de carrapatos. Parasitam uma grande variedade de animais domésticos e silvestres, e também o Homem (Solano-Gallego et al. 2016; Baneth 2018). É zoonose de preocupação crescente pela atual emergência no cão (Matijatko et al. 2012; René et al. 2012) e no Homem (Mehlhorn 2011; René et al. 2012).

Existem diversas espécies de *Babesia* spp. envolvidas na piroplasmose canina (René et al. 2012; Solano-Gallego et al. 2016). Tradicionalmente, *Babesia* spp. pode ser dividida em dois grupos de acordo com o tamanho e morfologia do parasita – *Babesia* spp. de grandes dimensões (*Babesia canis* e suas subespécies) (Matijatko et al., 2012; Mehlhorn, 2011; Solano-Gallego et al., 2016) e *Babesia* spp. de pequenas dimensões (onde se inclui *Babesia gibsoni*, *Babesia conradae* e *Babesia microti-like*) (Mehlhorn 2011; Solano-Gallego et al. 2016). Esta distinção pode efetuar-se pela observação de um esfregaço sanguíneo (Solano-Gallego et al. 2016).

B. canis são parasitas piriformes com dimensões entre os 4-5 µm, aparecendo geralmente em pares no interior de eritrócitos (Zajac and Conboy 2012; M.A. Taylor 2016). Formas amebóides também já foram descritas, de menores dimensões, contendo um vacúolo.

Existem três subespécies de *B. canis*, a saber: *B. canis canis*, *B. canis rossi* e *B. canis vogeli* (M.A. Taylor 2016). Idênticas morfológicamente, diferem bastante na sua distribuição geográfica, vetores competentes e severidade de quadro clínico (Matijatko et al. 2012).

B. gibsoni é um protozoário de forma anelar a oval, com dimensão entre 1 e 3 µm (M.A. Taylor 2016). *B. conradae* e *B. microti-like* são outras duas espécies de *Babesia* spp. de menor dimensão (Baneth 2018).

3.3.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Babesia* spp. pressupõe um hospedeiro vertebrado e um hospedeiro invertebrado (Mehlhorn 2011). Quando o ixodídeo se alimenta no hospedeiro vertebrado liberta os esporozoítos de *Babesia* spp. que entram na circulação sanguínea, aderindo à membrana dos eritrócitos e entrando por endocitose. No interior dos eritrócitos, reproduz-se assexuadamente, originando merozoítos. Esta multiplicação resulta na rotura dos eritrócitos, com a libertação dos merozoítos que infetam novas células (Mehlhorn 2011; Alvarado-Rybak et al. 2016; Solano-Gallego et al. 2016). No estado crónico, o parasita aloja-se nos capilares do fígado, baço ou de outros órgãos, sendo periodicamente libertado na corrente sanguínea (M.A. Taylor 2016). Quando um novo ixodídeo com capacidade vetorial ingere sangue de um animal infetado, ingere os merozoítos de *Babesia* spp. A reprodução sexuada do parasita ocorre no intestino do artrópode, seguindo-se a fase assexuada nos tecidos deste, atingindo as suas glândulas salivares e oócitos. A transmissão de *Babesia* spp. ocorre, sobretudo, de forma transestadial – o parasita é transmitido entre os vários estadios do ciclo de vida do artrópode. No entanto, *B. canis* e suas subespécies têm transmissão transovárica (Fig.1) (Mehlhorn 2011) – a transmissão ocorre através dos ovos do artrópode (Solano-Gallego and Baneth 2011). São necessárias 48 horas de fixação do ixodídeo no hospedeiro vertebrado para completar a esporogonia de *Babesia* spp., necessária à sua transmissão ao cão (M.A. Taylor 2016; Solano-Gallego et al. 2016; Fourie et al. 2019).

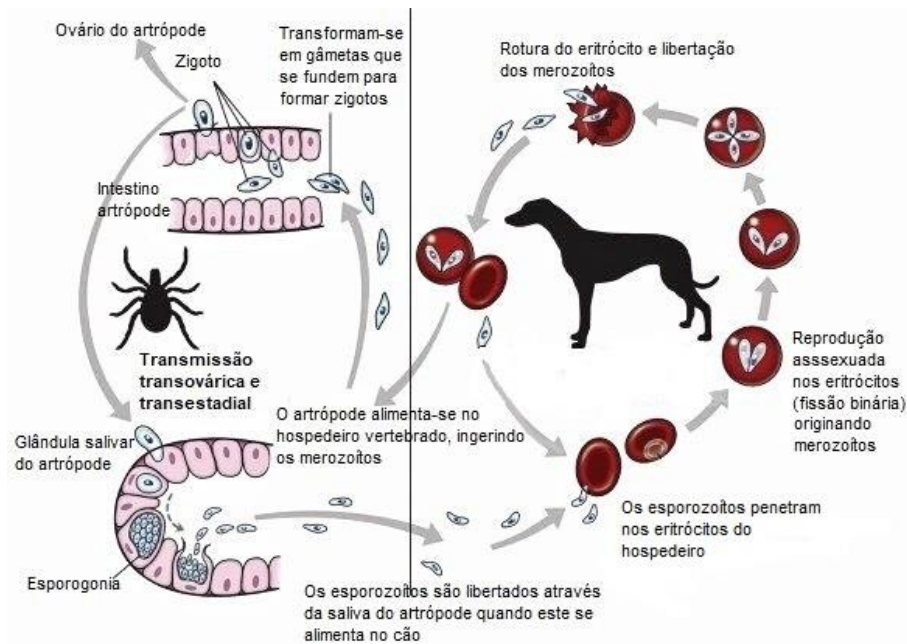


Figura 1 - Ciclo de vida de *B. canis* (Adaptado de: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/babesiosis>)

3.3.2. Vetores e hospedeiros

As diferentes subespécies de *B. canis* são transmitidas por diferentes artrópodes. Enquanto *B. canis canis* tem como vetor *Dermacentor reticulatus*, *B. canis vogeli* é transmitida por *R. sanguineus* (Alvarado-Rybak et al. 2016; Baneth 2018; Geurden et al. 2018) e *B. canis rossi* por *Haemaphysalis leachi* (Alvarado-Rybak et al. 2016; M.A. Taylor 2016) e *Haemaphysalis eliptica* (Baneth 2018). Está descrita, também, a transmissão vertical de *B. canis* (Alvarado-Rybak et al. 2016; Solano-Gallego et al. 2016). *D. reticulatus* distribui-se por todo o continente europeu, demonstrando tendência para zonas com clima frio e húmido. Como tal, apresenta maior atividade entre Outubro e Março. A carraça adulta parasita o cão, mas as formas imaturas alimentam-se em roedores selvagens (Solano-Gallego et al. 2016). *R. sanguineus* é endémica na zona mediterrânica (Solano-Gallego et al. 2016). O principal hospedeiro de *B. canis* e suas subespécies é, como o próprio nome indica, o cão (M.A. Taylor 2016)

B. gibsoni é transmitida pelos artrópodes *Haemaphysalis bispinosa* e *Haemaphysalis longicornis* na Ásia e *R. sanguineus* na Europa, sendo o seu hospedeiro preferencial o cão (M.A. Taylor 2016; Solano-Gallego et al. 2016; Baneth 2018). Está também descrita a sua transmissão através de feridas e mordidas, transmissão vertical e iatrogénica (Alvarado-Rybak et al. 2016; Solano-Gallego et al. 2016). Embora não totalmente esclarecido, julga-se que *B. microti-like* tenha *Ixodes hexagonus* como vetor (Solano-Gallego et al. 2016; Checa et al. 2019). Este ixodídeo não é abundante na vegetação, sendo que as formas imaturas são

comummente encontradas em grutas e cavernas, parasitando, sobretudo, ouriços, javalis, raposas, cães de caça ou buscas (Solano-Gallego et al. 2016). Ressalva-se, no entanto, que o DNA de *B. microti-like* já foi identificado em carraças da espécie *D. reticulatus*, *I. ricinus*, *I. canisuga* e *R. sanguineus* (Alvarado-Rybak et al. 2016; Checa et al. 2019). Existe evidência de transmissão desta espécie através de mordidas (Baneth 2018; Checa et al. 2019), transmissão vertical e iatrogénica (Checa et al. 2019). Não está descrito à atualidade qual o vector de *B. conradae* (Baneth 2018).

Babesia spp. já foi encontrada em 33 carnívoros, pertencentes a 8 famílias na Europa, Ásia, África e América. Várias espécies de artrópodes têm, também, um papel na manutenção de um ciclo selvático da doença. Os carnívoros selvagens podem atuar como agentes reservatórios ou verdadeiros hospedeiros competentes, não estando, para já, esclarecido quais as espécies que se comportam como tal, bem como as consequências que este ciclo representa para a vida selvagem, animais domésticos e Homem (Alvarado-Rybak et al. 2016).

3.3.3. Distribuição geográfica e prevalência em Portugal

Considerada uma doença de distribuição mundial (Baneth 2018), a distribuição geográfica de cada espécie/subespécie de *Babesia* spp. apresenta variabilidade em função da respetiva distribuição dos seus vetores competentes (Solano-Gallego et al. 2016).

O número de casos de doença diagnosticados na Europa tem vindo a aumentar, sobretudo por migração dos diferentes vetores para áreas geográficas anteriormente indemnes (Matijatko et al. 2012). Na Europa, foram apenas reportados casos de infeção por *B. canis canis*, *B. canis vogeli*, *B. gibsoni* e *B. microti-like* (Solano-Gallego et al. 2016).

B. canis canis distribui-se por toda a Europa, sendo a principal espécie envolvida nos casos diagnosticados em cães. Apesar de ser característica dos países da Europa central, estão registados casos clínicos em praticamente todo o território europeu (Solano-Gallego et al. 2016; Checa et al. 2019), inclusive Portugal (Maia, Almeida, et al. 2015). Atualmente é considerada espécie emergente no Reino Unido (Baneth 2018), além dos surtos reportados recentemente na Holanda, Bélgica, Suíça, Polónia, entre outros, provavelmente explicados pela expansão de *D. reticulatus* no espaço europeu (Mierzejewska et al. 2018; Fourie et al. 2019). *B. canis rossii* encontra-se, sobretudo, no sul do continente africano. *B. canis vogeli* é a subespécie que apresenta maior e mais ampla distribuição, sendo encontrada na Europa, África, Ásia, Austrália, e América (René et al. 2012; M.A. Taylor 2016), tendo já sido encontrada em Portugal (Maia, Almeida, et al. 2015; Solano-Gallego et al. 2016).

B. gibsoni é endémica no sudeste asiático e no Japão, tendo já alargado a sua distribuição ao norte de África, Austrália, Europa e América (Zajac and Conboy 2012; M.A. Taylor 2016; Baneth 2018). Atualmente, a zona da Galiza, Espanha, é a única área da Europa considerada endémica de *B. gibsoni* (Checa et al. 2019). Apesar dos escassos dados sobre

a distribuição geográfica de *B. microti-like*, existem relatos da sua deteção na América do Norte e Europa, inclusive Portugal, no cão e na raposa (Alvarado-Rybak et al. 2016; Solano-Gallego et al. 2016; Baneth 2018; Checa et al. 2019). São comuns os casos clínicos na Raposa Vermelha, facto que sugere esta espécie como um potencial hospedeiro de *B. microti-like* na Europa e EUA (Baneth 2018; Checa et al. 2019). *B. conradae* está reportada em cães residentes na Califórnia (Baneth 2018).

Em Portugal, estima-se que *B. canis canis* se distribua sobretudo no norte do país, uma vez que o principal vetor – *D. reticulatus* – é abundante nesta região (Maia, Almeida, et al. 2015). No entanto, num estudo realizado de 2007/2008 foi registada uma seroprevalência de *Babesia* spp de 58% em 331 canídeos autóctones do sul do país (Maia, Almeida, et al. 2015).

3.3.4. Patogénese

Anemia hemolítica multifatorial e um síndrome inflamatório sistémico que resulta, muitas vezes, em falência multiorgânica são os principais mecanismos patológicos do parasita (Solano-Gallego and Baneth 2011).

A anemia pode ser regenerativa ou não-regenerativa, consoante o curso da doença e a espécie/subespécie do parasita envolvido (Solano-Gallego et al. 2016). Resulta de vários mecanismos fisiopatológicos – lise eritrocitária, processos imunomediados secundários (Matijatko et al. 2012; Solano-Gallego et al. 2016), fagocitose, sequestro esplénico e eritropoiese deficitária. Eritrócitos não parasitados também sofrem lise (Matijatko et al. 2012; Solano-Gallego et al. 2016). Choque, hipotensão e hipóxia são consequências severas da anemia, sendo responsáveis pela taquicárdia e taquipneia muitas vezes apresentadas, além de muitas das afeções secundárias que acontecem nos vários órgãos (rim, cérebro e músculo, sobretudo) (Solano-Gallego and Baneth 2011; Matijatko et al. 2012).

3.3.5. Predisposição

Na Hungria, foi reportada maior predisposição à doença por *B. canis* nos cães de raça Pastor Alemão e Komondor (Solano-Gallego et al. 2016). Estudos sugerem que fêmeas inteiras têm menor risco de doença provocada por *B. canis rossi* (Solano-Gallego et al. 2016). Animais jovens desenvolvem doença com maior severidade quando parasitados com qualquer uma das subespécies de *B. canis*. Em contrapartida, cães mais velhos quando infetados com *B. microti-like* apresentaram azotémia – principal complicação e causa de morte na doença provocada por esta espécie – com maior frequência (Solano-Gallego et al. 2016). Está descrita uma maior prevalência de *B. gibsoni* em Pit Bull Terrier, facto que pode ser explicado pela transmissão direta através de mordidas, estando esta raça frequentemente

envolvido em lutas (Solano-Gallego and Baneth 2011; Checa et al. 2019). Também nesta raça é comum a manifestação severa da doença (Solano-Gallego and Baneth 2011; Baneth 2018).

3.3.6. Vacinação

Na Europa é comercializada a Eurican Piro® (Merial), vacina que confere proteção imunológica contra a infeção por *B. canis* (Dantas-Torres and Otranto 2016; M.A. Taylor 2016). Atua através de uma proteína recombinante produzida a partir dos antígenos dos merozoítos de *B. canis* (Nathaly Wieser et al. 2019), tendo a saponina como solvente (Schetters 2005). A vacina não impede a infeção, mas diminui os níveis de parasitemia e atenua as manifestações clínicas, resultando em menores índices de mortalidade (Dantas-Torres and Otranto 2016; Solano-Gallego et al. 2016; Fourie et al. 2019). Os animais podem ser vacinados a partir dos 5 meses de idade e a re-vacinação é anual, estando recomendada pela ESCCAP a re-vacinação semestral em zonas muito endémicas (Dantas-Torres and Otranto 2016). Não confere proteção cruzada contra outras espécies de *Babesia* spp. (Dantas-Torres and Otranto 2016; Solano-Gallego et al. 2016).

3.3.7. Saúde pública

Nos últimos anos, casos de babesiose humana têm vindo a aumentar (Alvarado-Rybak et al. 2016; Nathaly Wieser et al. 2019). *B. divergens*, *B. microti*, *B. venatorum* e *B. duncani* são as principais espécies envolvidas na doença humana (Esch and Petersen 2013; Solano-Gallego et al. 2016), Nenhuma *Babesia* spp. que parasita o cão e/ou gato parece ter potencial zoonótico, mas em muitos dos casos de babesiose humana não são identificadas quais as espécies que estão na origem da doença. Além disso, o Homem pode ser hospedeiro acidental para numerosas espécies de *Babesia* spp., pelo que estes dados podem não corresponder à realidade (Alvarado-Rybak et al. 2016; Solano-Gallego et al. 2016).

Na Europa, a doença humana é causada por *B. divergens* – parasita das espécies pecuárias –, transmitido por *I. ricinus*. A maioria das babesioses, no Homem, permanecem subclínicas ou assumem uma gravidade moderada. No entanto, em indivíduos imunocomprometidos ou sujeitos a esplenectomia, esta pode revelar-se uma patologia severa e fatal (Centeno-Lima et al. 2003; Esch and Petersen 2013; Solano-Gallego et al. 2016). O período de incubação é, geralmente, de 1 a 3 semanas, e as manifestações clínicas são semelhantes a uma situação gripal. Febre, dores articulares e fraqueza são alguns dos sinais clínicos manifestados. Mais específicos estão registados hemoglobinúria, anemia hemolítica, hepatoesplenomegália e icterícia (Mehlhorn 2011). Em Portugal está reportado um caso de doença fatal, num paciente de 66 anos, esplenectomizado, infetado por *B. divergens* (Centeno-Lima et al. 2003).

Apesar de ser uma doença emergente, não existe nem está prevista a criação de uma vacina com as principais estirpes de babesia responsáveis pela doença no Homem. No entanto, o gado bovino pode ser vacinado com antigénios solúveis de *B. divergens*, a principal espécie envolvida nos casos de babesiose humana na Europa, sendo, indiretamente, uma forma de prevenção também no Homem (Nathaly Wieser et al. 2019).

3.4. Sinais clínicos, diagnóstico, tratamento e prevenção das doenças transmitidas por artrópodes

Considerando que existe alguma paridade entre o quadro clínico, diagnóstico, prevenção e tratamento das três doenças transmitidas por artrópodes e, atendendo que os aspetos clínicos destas não são o ponto fulcral da presente dissertação, embora imprescindíveis de mencionar, estas secções serão descritas e sintetizadas, em simultâneo, na tabela 1. Também como forma de síntese e para facilitar a leitura, serão apenas abordados os aspetos referentes a *A. phagocytophilum*, *E. canis* e *B. canis* – espécies pesquisadas no âmbito do rastreio realizado na presente dissertação. A anaplasmoze, erliquiose e babesiose são doenças cujo espectro de manifestações clínicas é abrangente e variado, podendo a infeção ser subclínica, moderada ou manifestar-se multissistemicamente de forma severa e fatal. A maioria dos animais não manifesta sinais clínicos. Quando manifestadas, a gravidade dos sinais clínicos demonstrados varia consoante a espécie/subespécie do agente infeccioso, carga parasitária que o animal apresenta, competência do sistema imunitário do hospedeiro, além da presença de doenças e/ou infeções concomitantes (Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016; Baneth 2018).

Tabela 1 – Principais aspetos do quadro clínico, diagnóstico, tratamento e prevenção das doenças transmitidas por artrópodes

	Sinais Clínicos	Diagnóstico	Tratamento	Prevenção
A. phagocytophilum	<ul style="list-style-type: none"> - Febre^(a,b,c); - Letargia^(a,b,c); - Anorexia^(a,b,c); - Esplenomegalia^(a,b,c); - Linfadenopatia^(a,b,c); - Claudicação^(a,b,c); - Diarreia^(a,b,c); - Vômito^(a,b,c); - Hemorragias^(a,b,c); - Uveítes^(a,b,c); - Exantema^(a,b,c); - Pneumonia^(d); - Sinais neurológicos^(a,b,c); - Falência multiorgânica^(a,b,c); - Choque^(a,b,c); 	<ul style="list-style-type: none"> - Análises sanguíneas: - Trombocitopenia^(c); - Anemia hemolítica^(a,f); - Hiperglobulinemia^(c); - Hipoalbuminemia^(c); - Leucopenia^(c); - Aumento da [ALT]^(c,d); - Aumento da [AST]^(c,d); - Sorologia (ELISA; IFI, sendo IFI a técnica mais utilizada)^(a,f); - PCR^(e,f); - Observação esfregaço sanguíneo (mórula no interior de granulócitos)^(e,f) 	<ul style="list-style-type: none"> - Tetraciclinas (doxiciclina é o fármaco de eleição, pelas suas propriedades lipofílicas: 10mg/kg, SID, durante 3 semanas^(c,f), podendo estender até às 4 semanas)^(a); - Fluoroquinolonas^(a,f); Medicação de suporte: <ul style="list-style-type: none"> - Prednisona/ prednisolona (0,5-2mg/kg, SID)^(a,f); - Fluidoterapia^(a,f); - Transfusões sanguíneas^(a,f); - Analgésicos^(a,f); 	<ul style="list-style-type: none"> - Aplicação rotineira de produtos com efeito acaricida e/ou repelente: amitraz, imidacloprid/ piretróides e fipronil (sob forma de coleiras, pipetas <i>spot on</i> ou comprimido)^(a,c,g,h); - em zonas endémicas, esta aplicação deve ser mantida durante todo o ano^(a,h);
E. canis	<ul style="list-style-type: none"> - Febre^(c,f,i); - Letargia^(c,f,i); - Anorexia^(c,f,i); - Perda de peso^(c,f,i); - Esplenomegalia^(c,f,i); - Linfadenomegalia^(c,f,i); - Hepatomegalia^(c,f,i); - Mialgia/Claudicação^(c,f,i); - Diarreia^(a,c,f); - Vômito^(a,c,f); - Hemorragias^(c); - Alterações oculares^(a,c,f); - Petéquias/equimoses^(c,f,i); - Dispneia^(a,c,f); - Corrimento nasal^(a,c,f); - Sinais neurológicos^(a,c,f); - Falência multiorgânica^(c); - Choque^(c); 	<ul style="list-style-type: none"> - Análises sanguíneas: - Trombocitopenia^(a,c,f); - Pancitopenia (fase crónica)^(c,f,i); - Anemia^(a); - Hiperglobulinemia^(a); - Hipoalbuminemia^(a); - Leucopenia^(c); - Aumento da [ALT]^(a,c); - Aumento da [AST]^(a,c); - Linfocitose^(a); - Sorologia (ELISA; IFI^(c,f), sendo IFI a técnica mais utilizada)^(c); - PCR^(a,c,f); - Observação esfregaço sanguíneo^(a,c,f) (mórula no interior de monócitos)^(c,i) 	<ul style="list-style-type: none"> - Tetraciclinas^(c) (doxiciclina é o fármaco de eleição, pelas suas propriedades lipofílicas: 10mg/kg, SID, durante 3 semanas^(c,i) (podendo estender até às 4 semanas)^(i,f); - Cloranfenicol^(c); Medicação de suporte: <ul style="list-style-type: none"> - Prednisona/ prednisolona (0,2-5mg/kg, SID)^(f,i); - Fluidoterapia^(a,f); - Transfusões sanguíneas^(a,f); - Eritropoietina^(f)/ Filgrastim⁽ⁱ⁾ (aplasia medular em casos crónicos) 	<ul style="list-style-type: none"> - Verificação, por parte dos tutores, da presença de artrópodes, procedendo à sua rápida e correta remoção, sempre que encontradas^(a,g,m) (é necessária a fixação do artrópode, pelo menos, 3h para transmissão de <i>E.canis</i>^(h) e 48h para transmissão de <i>B.canis</i>^(o); - Restringir acesso a zonas onde se julga existir maior abundância de artrópodes (vegetação/pasto)^(a,f,h,m); - Manter limpa e cuidada a área em redor da habitação; pulverizá-la com produtos com efeito repelente e/ou acaricida^(h);
B. canis	<ul style="list-style-type: none"> - Febre^(c,m); - Letargia^(c,m); - Anorexia^(c,m); - Esplenomegalia^(m); - Linfadenomegalia^(m); - Mialgia/Rabdomiólise; - Diarreia^(m); - Vômito^(m); - Uveíte/Cegueira; - Petéquias/equimoses^(c); - Stress respiratório agudo^(m); - Efusões pleurais/pericárdicas^(c); - Icterícia^(c,m); - Doença renal^(m); - Pancreatite^(m); - Ascite^(m); - Sinais neurológicos^(c); - Falência multiorgânica^(c); 	<ul style="list-style-type: none"> - Análises sanguíneas: - Trombocitopenia^(m); - Anemia^(c,m); - Hipoalbuminemia^(m); - Hemoglobinúria^(m); - Bilirrubinúria^(m); - Hiperbilirrubinemia^(m); - Sorologia (ELISA; IFI^(c,m), sendo IFI a técnica mais utilizada)^(c); - PCR^(m); - Observação esfregaço sanguíneo (mórula no interior de eritrócitos)^(c,m) 	<ul style="list-style-type: none"> - Dipropionato de imidocarb (6,6mg/kg, IM ou SC); alguns autores sugerem uma 2ª dose passadas duas semanas^(m,n); - Diminazeno (3,5mg/kg, IM); dose única; uso restrito só em casos refratários^(m,n); Medicação de suporte: <ul style="list-style-type: none"> - Fluidoterapia^(m); - Transfusões sanguíneas^(m,n); - Prednisona (2mg/kg SID)^(m); - Doxiciclina (10mg/kg, PO, SID): reduz manifestação de sinais clínicos e mortalidade^(m); 	

(a)(Little 2010);(b)(Cardoso et al. 2012);(c)(M.A. Taylor 2016);(d)(Mehlhorn 2011);(e)(Stuen et al. 2013);(f)(Sainz et al. 2015);(g)(Millán et al. 2016);(h)(Dantas-Torres and Otranto 2016);(i)(Harrus 2015);(j)(Borin et al. 2009);(l)(Palacios et al. 2017); (m)(Solano-Gallego et al. 2016);(n)(Baneth 2018);(o) (Fourie et al. 2019)

3.5. *Leishmania* spp.

Leishmania spp. são protozoários pertencentes à ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, género *Leishmania*, responsáveis por doença cutânea e visceral em mamíferos, incluindo o Homem (M.A. Taylor 2016). São protozoários heteroxenos, dependentes de um vetor para a conclusão do seu ciclo de vida e transmissão (Ribeiro et al. 2018). Os insetos do género *Phlebotomus* e *Lutzomyia* atuam como os seus hospedeiros intermediários e vetores (Zajac and Conboy 2012). No hospedeiro vertebrado, *Leishmania* spp. existe na forma amastigota – redonda a ovalada, com núcleo bem definido, cinetoplasto e flagelo rudimentar – em macrófagos e outras células do sistema reticuloendotelial da pele, baço, fígado, medula óssea, linfonodos e mucosas; pode também ser observada nos leucócitos circulantes (Zajac and Conboy 2012; M.A. Taylor 2016). No inseto vetor, encontra-se sob a forma promastigota, fusiforme, com um flagelo desenvolvido na porção posterior (M.A. Taylor 2016).

Leishmania infantum, *Leishmania donovani* e *Leishmania chagasi* são as três principais espécies envolvidas na leishmaniose visceral, a forma mais severa da doença (Iborra et al. 2018). *Leishmania braziliensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania amazonensis* (Oliveira et al. 2019), *Leishmania major* e *Leishmania tropica* são algumas das espécies envolvidas na forma cutânea (Iborra et al. 2018).

É uma zoonose emergente (Ribeiro et al. 2018; Travi et al. 2018; Dantas-Torres et al. 2019), estimando-se que ocorram 40 000 mortes/ano, vítimas da doença (Asfaram et al. 2019).

3.5.1. Ciclo de vida

Ao alimentar-se no hospedeiro vertebrado, o inseto fêmea ingere as formas amastigotas que se transformam em promastigotas no intestino do vetor. Aqui, multiplicam-se por divisão binária, migrando até à probóscide do inseto, onde ficam até este se alimentar num novo hospedeiro (Maia and Campino 2018). Quando tal acontece, o inseto inocula no local da picada compostos ativos que facilitam a sucção sanguínea e modulam a resposta imunitária do hospedeiro, privilegiando a transmissão do agente (Iborra et al. 2018). As formas promastigotas são inoculadas, sendo fagocitadas pelos macrófagos do hospedeiro, onde recuam à sua forma amastigota, continuando a sua divisão/multiplicação até à lise do macrófago (Ribeiro et al. 2018). O parasita dissemina-se, assim, através da invasão dos macrófagos do fígado, baço, medula óssea e linfonodos (Ribeiro et al. 2018). O ciclo de vida de *L. infantum* encontra-se esquematizado na figura 2.

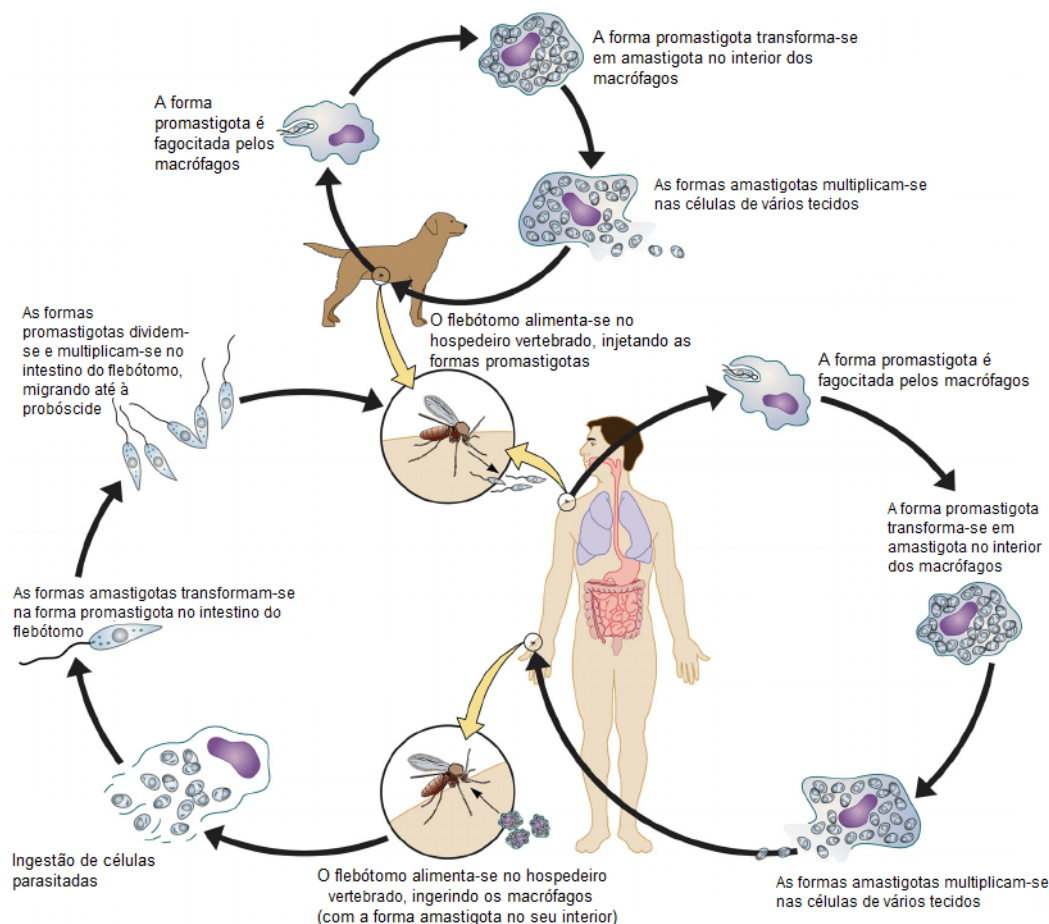


Figura 2 - Ciclo de vida de *L. infantum* (Adaptado de: https://www.researchgate.net/figure/The-life-cycle-of-Leishmania-species-Sandflies-inject-infective-promastigotes-into-a_fig10_234087025)

3.5.2. Vetores e hospedeiros

A infecção natural ocorre com maior frequência em cães e roedores, estando também descrita em felídeos, primatas, lagomorfos, marsupiais (Ribeiro et al. 2018), carnívoros silvestres e répteis (M.A. Taylor 2016). São cerca de 70 as espécies de mamíferos (Ribeiro et al. 2018), domésticos e selvagens (Asfaram et al. 2019), reportadas como hospedeiros das diferentes espécies de *Leishmania* (Ribeiro et al. 2018; Asfaram et al. 2019). No entanto, nem todos são considerados verdadeiros hospedeiros reservatório (Oliveira et al. 2019), não estando, para já, esclarecido qual o papel que cada um destes representa na epidemiologia e manutenção do ciclo de vida do parasita (Ribeiro et al. 2018). O cão é considerado o principal hospedeiro reservatório em ambiente urbano, representando, portanto, a principal fonte de infecção para o Homem (M.A. Taylor 2016; Duthie et al. 2018; Maia and Campino 2018).

O inseto vetor pertence à ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psicodídae, subfamília Phlebotominae (Gálvez, Montoya, Fontal, Martínez De Murguía, & Miró, 2018),

género *Lutzomyia* na América e Oceania e género *Phlebotomus* na Europa, África e Ásia (M.A. Taylor 2016; Ribeiro et al. 2018). Em Portugal apenas se reconhece importância epidemiológica na transmissão de *Leishmania* spp. a *Phlebotomus ariasi* e *Phlebotomus perniciosus* (Campino and Maia 2010). Os flebotomos distribuem-se em climas tropicais, subtropicais e temperados (Gálvez et al. 2018), sendo encontrados em diversos microhabitats com diferentes características ao longo de toda a área mediterrânica (Mihalca et al. 2019). O ritmo a que o seu ciclo de vida se completa depende, em grande parte, da temperatura e teor de humidade (Gálvez et al. 2018): a temperatura mínima para a atividade do flebotomo é de 17 °C (Gálvez et al. 2018), embora o ciclo de vida seja potenciado entre os 24° C e os 28° C, com uma humidade relativa a rondar os 70-95% (Mihalca et al. 2019). O período de atividade máxima é registado entre as 20h e as 22h (Gálvez et al. 2018). As principais espécies de flebotomos existentes na área mediterrânica são consideradas exofágicas e exofílicas – alimentam-se e repousam em ambiente exterior (Gálvez et al. 2018). A postura de ovos acontece em solos ricos em matéria orgânica, uma vez que as larvas necessitam desta para o seu desenvolvimento e passagem ao estadio adulto (Gálvez et al. 2018; Mihalca et al. 2019).

A transmissão venérea e transplacentária já foi documentada em ratos, cão e Homem. Transmissão iatrogénica também deve ser considerada e acautelada (Ribeiro et al. 2018).

3.5.3. Distribuição geográfica e prevalência em Portugal

Com distribuição global (Zajac and Conboy 2012), *Leishmania* spp. é endémica na Ásia central, médio oriente, América central e América do sul, além da área mediterrânica (Dantas-Torres et al. 2019), onde são registadas taxas de infeção até 63% (Pineda et al. 2017). A área europeia considerada endémica da doença está, atualmente, a estender-se para norte (Dantas-Torres et al., 2019; Gálvez et al., 2018).

Na Europa, África e Ásia, a forma visceral da doença é causada por *L. infantum* e *L. donovani* (Iborra et al. 2018), sendo *L. infantum* o principal agente etiológico na zona mediterrânica (Mihalca et al. 2019). Não é considerada uma doença endémica dos países do leste europeu, embora ultimamente tenham sido reportados casos autóctones, no cão e no Homem (Mihalca et al. 2019). É uma doença endémica no nosso país, com uma prevalência média de 6,3% (Maia, Almeida, et al. 2015). A prevalência de *L. infantum*, segundo Cardoso et al., é de 4,3% em animais aparentemente saudáveis, subindo para 25,2% em animais com sinais clínicos. Parece existir uma maior seroprevalência em animais residentes na zona sul do país, provavelmente pelas condições geoclimáticas destas regiões favoráveis à proliferação do inseto vetor. No Alentejo, a prevalência situa-se nos 5,9% em animais sem sinais clínicos, sendo 27,2% em animais com sinais clínicos (Cardoso et al. 2012). *L. chagasi* é o principal agente envolvido na forma visceral da doença na América (Iborra et al. 2018), endémica nos países da América central e América do sul (M.A. Taylor 2016).

A leishmaniose cutânea é a forma da doença mais prevalente, sobretudo nos países do médio oriente e América latina, onde se destaca o Brasil (Oliveira et al. 2019). *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* são cinco das quinze espécies envolvidas na doença cutânea (Oliveira et al. 2019). Na Europa, África e Ásia, a forma cutânea é provocada por *L. major* e *L. tropica* (Iborra et al. 2018). Algumas espécies envolvidas na forma cutânea podem, também, originar doença visceral (Oliveira et al. 2019).

3.5.4. Patogénese

L. infantum é o principal agente envolvido na forma visceral e cutânea da doença, na Europa (M.A. Taylor 2016). A forma cutânea é, contudo, mais frequente (Oliveira et al. 2019).

A relação entre o parasita – virulência da estirpe e carga parasitária – e o hospedeiro – sistema imunitário, condição física e presença de infeções concomitantes – determinam se a infeção se mantém subclínica/crónica durante toda a vida do animal ou evolui, a qualquer momento, para um quadro severo (Duthie et al. 2018; Maia and Campino 2018; Moreno 2019). O quadro da doença é, sobretudo, crónico, de gravidade moderada e baixas taxas de mortalidade. Ocasionalmente são observadas manifestações agudas de rápida evolução que culminam em morte (M.A. Taylor 2016). Em áreas endémicas, os animais podem ser infetados mantendo-se subclínicos durante meses ou anos, podendo, inclusive, tornar-se imunes ao agente (M.A. Taylor 2016; Duthie et al. 2018; Maia and Campino 2018), e atuar como reservatórios do parasita, contribuindo para a perpetuação da infeção (Moreno 2019). Uma resposta eficiente à infeção por *Leishmania* spp. pressupõe um equilíbrio entre a imunidade inata e adaptativa (Iborra et al. 2018). No entanto, a imunidade humoral adaptativa é principal via de resposta imunitária na infeção pelo parasita – uma resposta predominante Th1 está associada a maior resistência à doença, característica em animais sem manifestações clínicas; uma resposta predominantemente Th2 está relacionada com maior suscetibilidade ao desenvolvimento da doença. Uma resposta Th2 propicia um microambiente rico em citocinas anti-inflamatórias que acaba por desativar a imunidade celular contra o parasita (Gonçalves et al. 2019). A progressão da doença, com o aparecimento de sinais clínicos, está, assim, relacionada com um aumento e exaustão da imunidade humoral (Pennisi and Persichetti 2018), acompanhado por uma diminuição da imunidade celular (Maia and Campino 2018). É, sobretudo, a eficácia da imunidade celular do paciente que determina o prognóstico e evolução da doença; se ineficaz, a doença toma o curso crónico com a persistência das lesões cutâneas e o aumento gradual das dimensões do fígado, baço e linfonodos (M.A. Taylor 2016).

3.5.5. Predisposição

Parece existir maior predisposição ao desenvolvimento de doença clínica nos cães de raça boxer, pastor alemão, cocker spaniel e rottweiler, associada à expressão do gene NRAMP1 e/ou ao polimorfismo do complexo major de histocompatibilidade II (Ribeiro et al. 2018). Pelo contrário, o podengo ibicenco parece apresentar maior resistência à doença, uma vez que possui uma forte imunidade celular (Pennisi and Persichetti 2018; Ribeiro et al. 2018).

Está documentada uma maior prevalência da doença em cães de trabalho, naturalmente pela sua maior exposição ao inseto vetor, uma vez que são animais que estão muito tempo no exterior (Ribeiro et al. 2018). Cães com idade inferior a 3 anos e superior a 8 anos parecem ser os animais nos quais mais frequentemente é diagnosticada a doença. Fatores relacionados com a suscetibilidade genética podem explicar o primeiro intervalo de idades; a progressão crónica da doença será, provavelmente, a causa que justifica o segundo intervalo (Pennisi and Persichetti 2018). Embora controversos, existem dados que sugerem que o comprimento do pêlo influencia o risco de picada do flebótomo (Ribeiro et al. 2018).

3.5.6. Vacina

A vacinação de cães visa o estabelecimento de uma imunidade específica de longa duração que, em caso de infeção, permita a minimização da multiplicação e disseminação do agente no organismo, diminuindo o risco de desenvolvimento de sinais clínicos (Moreno 2019) e a sua severidade (Fernández Cotrina et al. 2018), limitando a transmissão do agente a outros cães e humanos (Dantas-Torres et al. 2019).

Estão disponíveis no mercado 3 vacinas para a leishmaniose canina (Fernández Cotrina et al. 2018). No Brasil existe a Leish-Tec® (Hertape Calier, Brasil), vacina que utiliza uma proteína recombinante – antigénio A2 –, tendo a saponina como adjuvante. Está demonstrada uma eficácia de 71,4% num estudo realizado em zona endémica do país. Quando testada em laboratório obteve 43% de eficácia (Fernández Cotrina et al. 2018). Na Europa, a primeira vacina a ser comercializada – Canileish® (Virbac, França) contém um liofilizado de proteínas secretadas-excretadas de *L. infantum* (LiESP) (M.A. Taylor 2016; Fernández Cotrina et al. 2018), com um extrato de *Quillaja saponaria* (QA-21) (Fernández Cotrina et al. 2018). O protocolo vacinal consiste em três doses iniciais, separadas por três semanas, com reforço anual (Fernández Cotrina et al. 2018). A taxa de eficácia ronda os 68,4% (Fernández Cotrina et al. 2018; Ribeiro et al. 2018). Mais recente, a Letifend® (laboratórios LETI, Espanha), usa uma proteína química recombinante (Proteína Q), obtida por fusão genética de cinco fragmentos antigénicos de proteínas de *L. infantum*. Induz uma resposta imune predominantemente humoral (através de IgG2) e alguma resposta imune celular. A vacinação com Letifend® reduz o risco de desenvolvimento de doença, com uma

eficácia de 72% na prevenção de casos clínicos em zonas endémicas (Fernández Cotrina et al. 2018).

3.5.7. Saúde pública

A leishmaniose é uma doença que assume relevância em saúde pública pelo seu carácter zoonótico e emergente (Moreno 2019). Está presente em cerca de 100 países com mais de 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose visceral humana e leishmaniose cutânea humana, por ano (Miró and López-Vélez 2018). Na Europa, ambas as formas da doença são causadas, predominantemente, por *L. infantum* (Miró and López-Vélez 2018). A ocorrência de casos de leishmaniose humana em áreas anteriormente indemnes está relacionada com a ocorrência de casos de leishmaniose canina e o estabelecimento de vetores competentes na mesma área (Moreno 2019). Apesar de controversos, alguns estudos de meta-análise sugerem que os tutores de animais infetados estão, também, em maior risco de contrair infeção (Travi et al. 2018). Assim, presume-se que controlando a infeção nas populações caninas, controla-se, indiretamente, o número de casos de doença no Homem (Duthie et al. 2018).

A transmissão da doença no Homem ocorre através da picada do flebótomo. Transmissão vertical e transmissão iatrogénica estão também descritas (Miró and López-Vélez 2018). A grande maioria dos pacientes permanece assintomático, estando a progressão da doença dependente, sobretudo, do sistema imunitário do indivíduo. Por esta razão, os pacientes imunocomprometidos (doentes com HIV, crianças, pacientes transplantados) são aqueles que têm maior risco de desenvolvimento de manifestações clínicas severas, com menor resposta ao tratamento. Os sinais clínicos da forma visceral da doença incluem febre, perda de peso, dor abdominal, anemia, hepatomegália, esplenomegália e linfadenomegália. As manifestações clínicas da forma cutânea incluem úlceras, nódulos, pápulas e cicatrizes. A forma visceral revela-se fatal, quando não tratada; a forma cutânea, por ser benigna, é autolimitante (Miró and López-Vélez 2018). Em Portugal, a doença ocorre, sobretudo, em crianças e doentes com HIV. No período de 2000 a 2009 foram diagnosticados 173 novos casos de leishmaniose visceral humana. A região do Alto Douro foi o foco mais ativo de infeção neste estudo epidemiológico, embora seja referido que à data da publicação, a área metropolitana de Lisboa era a zona onde se registavam mais casos. Por ano, estima-se que sejam diagnosticados dez novos casos de leishmaniose cutânea humana, sobretudo nas bacias hidrográficas dos rios Douro, Tejo e Sado (Campino and Maia 2010).

Não está, por enquanto, disponível uma vacina para uso humano, sendo os protocolos terapêuticos existentes também limitados (Iborra et al. 2018; Miró and López-Vélez 2018). A prevenção é a melhor arma para combater a doença e passa pelo controlo do flebótomo mediante a utilização de repelentes (em cães, no Homem e no perímetro da habitação),

tratamento de cães infetados e eliminação de micro-habitats que favoreçam o estabelecimento de uma população de flebótomos (Miró and López-Vélez 2018).

3.6. *Dirofilaria* spp.

Dirofilaria spp. são helmintes pertencentes à ordem Spirurida, superfamília Filarioidea, família Onchocercidae, género *Dirofilaria*. São conhecidas duas espécies: *D. immitis* e *D. repens* (Meireles et al. 2014; M.A. Taylor 2016). São parasitas heteroxenos, necessitando de um inseto vetor para concluir o seu ciclo de vida e garantir a transmissão a novos hospedeiros (Meireles et al. 2014; A.H.Society 2018). Os mosquitos do género *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* são os seus hospedeiros intermediários e vetores (Meireles et al. 2014; M.A. Taylor 2016).

Dirofilaria immitis é um nemátode filariforme, coberto por cutícula, com 15 a 30 cm de comprimento (M.A. Taylor 2016). Os parasitas adultos alojam-se nas artérias pulmonares (Meireles et al. 2014; Carretón et al. 2017) e ventrículo direito do coração (Meireles et al. 2014) de cães e outros carnívoros. Ocasionalmente, parasita o Homem (Meireles et al. 2014; Capelli et al. 2018). *Dirofilaria repens* é um nemátode filariforme com 5 a 17cm de comprimento (M.A. Taylor 2016). Esta espécie aloja-se no tecido subcutâneo e tecido intermuscular (M.A. Taylor 2016; Genchi and Kramer 2017), causando, geralmente, uma infeção sem manifestação de sinais clínicos (Capelli et al. 2018) ou de reduzida patogenicidade em canídeos (Maia, Lorentz, et al. 2015).

3.6.1. Ciclo de vida

Os nemátodes adultos de *D. immitis* alojam-se na aurícula e ventrículo direitos, artéria pulmonar e veia cava do hospedeiro (M.A. Taylor 2016; A.H.Society 2018). As fêmeas adultas libertam continuamente microfírias para a circulação, podendo estas sobreviver vários meses em circulação até nova ingestão pelo mosquito fêmea. Nos túbulos de malpighi do mosquito ocorre a maturação das microfírias até à forma L3 – forma infecciosa (Meireles et al. 2014; M.A. Taylor 2016; A.H.Society 2018). A maturação destas larvas depende da temperatura (McCall et al. 2004; A.H.Society 2018): abaixo de 14°C não existe desenvolvimento larvar, pelo que a temperatura ambiental dita a sazonalidade da infeção (Genchi et al. 2005). As L3 migram para as peças bucais do vetor, sendo transmitidas a um novo hospedeiro vertebrado na seguinte refeição sanguínea. No cão, as L3 migram no tecido subcutâneo e muscular do tórax, sofrendo duas mudas até L5 (Meireles et al. 2014) e entram na circulação sanguínea, alonjando-se no coração e pulmões (M.A. Taylor 2016; A.H.Society 2018). É nesta migração que ocorrem, por vezes, migrações erráticas, com destaque para o SNC, câmara anterior do olho ou tecido subcutâneo/muscular (Meireles et al. 2014). Os

nemátodes adultos tornam-se sexualmente maduros 120 dias pós-infecção, libertando novas microfilárias para a circulação (A.H.Society 2018). Assim, a infecção demora, pelo menos, 6 meses a tornar-se patente (M.A. Taylor 2016), sendo definido um período pré-patente de 7 a 9 meses (A.H.Society 2018). O ciclo de vida de *D. immitis* encontram-se esquematizado na figura 3. O ciclo de vida de *D. repens* é semelhante, mas os nemátodes adultos desta espécie alojam-se no tecido subcutâneo, intramuscular e conjuntivo (Genchi and Kramer 2017; Capelli et al. 2018). O período pré-patente é cerca de 27 a 34 semanas (M.A. Taylor 2016; Genchi and Kramer 2017; Capelli et al. 2018).

As microfilárias têm um período de atividade maioritariamente diurno, o que coincide com o período de maior atividade do inseto vetor (M.A. Taylor 2016).

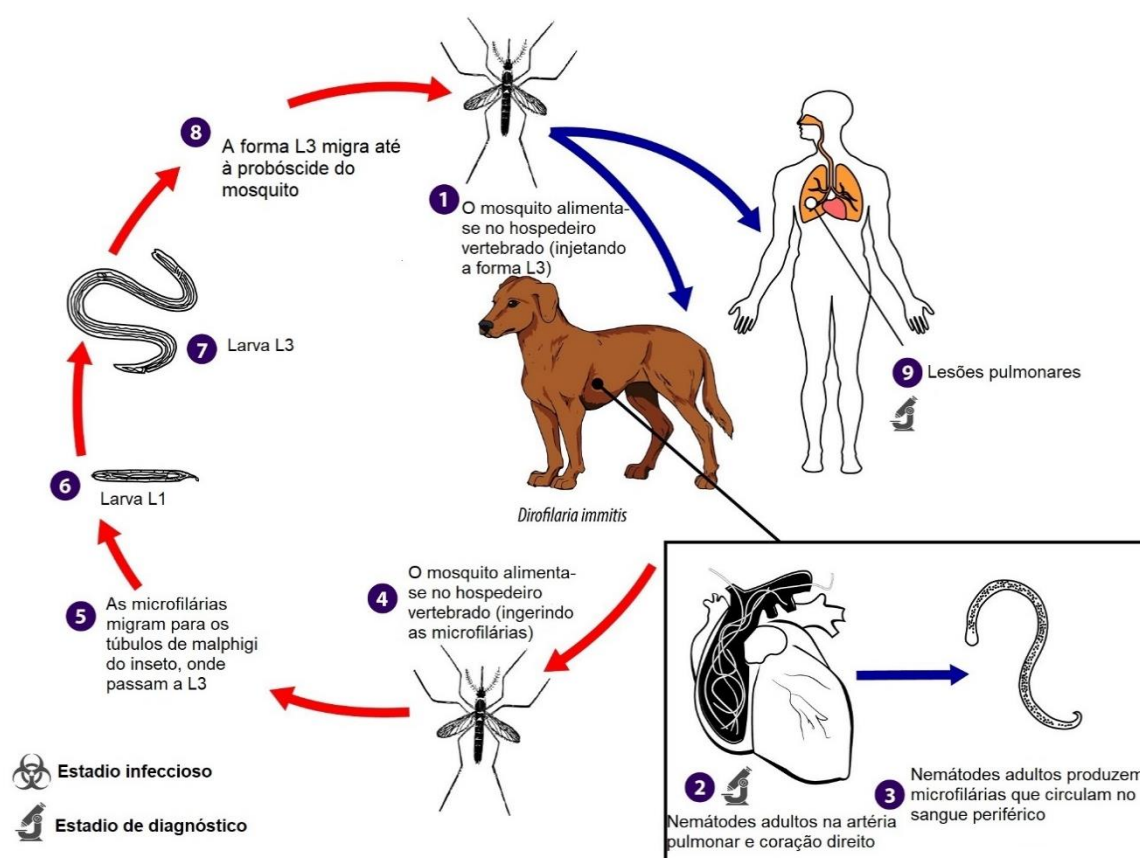


Figura 3 - Ciclo de vida de *D. immitis* (Adaptado de: <https://www.cdc.gov/parasites/dirofilariasis/biology.html>)

3.6.2. Vetores e hospedeiros

O ciclo de vida de *Dirofilaria* spp. pressupõe dois hospedeiros: invertebrado – mosquitos da família Culicidae, géneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* – e vertebrado – canídeos domésticos e selvagens (Meireles et al. 2014; M.A. Taylor 2016; A.H.Society 2018). Estes animais, sobretudo os canídeos domésticos, desenvolvem tendencialmente maiores concentrações de microfilárias, atuando como os principais reservatórios da infeção (Capelli et al. 2018; A.H.Society 2018). Ocasionalmente, a infeção pode ocorrer no gato (Meireles et

al. 2014; Capelli et al. 2018; A.H.Society 2018), furão (A.H.Society 2018), raposa (Meireles et al. 2014; Capelli et al. 2018) e Homem (Meireles et al. 2014). Nestas espécies, a microfilarémia é transiente, sendo, teoricamente, uma fonte de infeção limitada para o inseto vetor (A.H.Society 2018). Infeção intrauterina também está reportada (M.A. Taylor, 2016).

3.6.3. Distribuição geográfica e prevalência em Portugal

A dirofilariose canina tem distribuição global (McCall et al. 2004; A.H.Society 2018). A revisão bibliográfica sugere que 1,2% a 48% dos animais testados são positivos a *D. immitis* (Dixon-Jimenez et al. 2018), prevalência tendencialmente crescente em cães (Genchi et al. 2005; Meireles et al. 2014). A prevalência de *D. repens* tem vindo a aumentar, também, em animais e no Homem (Maia, Lorentz, et al. 2015; Genchi and Kramer 2017; Capelli et al. 2018).

A infeção por *D. immitis* está reportada na América, Europa, Índia, China, Japão e Austrália (M.A. Taylor 2016; A.H.Society 2018). Na Europa, é prevalente na região mediterrânica (Genchi et al. 2005), tendo sido registado um aumento do número de casos nos países do norte e leste da Europa (Meireles et al. 2014). Em Portugal, a média de prevalência situa-se entre os 3,6% a 8,9% (Maia, Coimbra, et al. 2015), atingindo os 40% na Ilha da Madeira (Cardoso et al. 2012). No Alentejo, a prevalência de infeção nesta região situou-se nos 4,7% em animais sem sinais clínicos e 14% em animais com sinais clínicos (Cardoso et al. 2012). *D. repens* é considerada uma espécie emergente (Capelli et al. 2018), endémica em vários países de África, Ásia e Europa. Na Europa, destacam-se a Itália, França e Grécia (Genchi and Kramer 2017), onde têm sido referidas as maiores incidências de infeção no Homem (Capelli et al. 2018). Novos focos endémicos surgem em áreas anteriormente indemnes, nomeadamente nos países do norte e leste da Europa (Genchi and Kramer 2017; Capelli et al. 2018).

A doença ocorre em climas temperados, com temperaturas e humidade favoráveis ao estabelecimento de uma população ativa de insetos vetores, bem como a maturação das microfilárias por ele ingeridas (A.H.Society 2018). As alterações climáticas e paisagísticas (Genchi et al. 2005; A.H.Society 2018) tornam favorável o desenvolvimento de larvas do inseto vetor, mesmo em meses e zonas com temperaturas frias. Este facto determina a expansão da área endémica (M.A. Taylor 2016), prolongamento do período de atividade do mosquito e período de transmissão da doença (A.H.Society 2018). Julho e Agosto são os meses em que se regista o pico de transmissão da doença, no hemisfério norte (McCall et al. 2004; A.H.Society 2018), sendo que em Portugal, no distrito de Portalegre em concreto, este ocorre, sobretudo, entre 31 de Maio e 20 de Outubro (Genchi et al. 2005). Em Portugal, o único caso de infeção autóctone por *D. repens* ocorreu no Algarve, num canídeo co-infetado com *D. immitis* (Maia, Lorentz, et al. 2015). Esta zona do país parece ter condições meteorológicas mais propícias a transmissão de dirofilariose (Maia, Lorentz, et al. 2015).

3.6.4. Patogénese

As manifestações clínicas da infecção por *D. immitis* relacionam-se com as formas adultas do parasita: localização e carga parasitária (Meireles et al. 2014; A.H.Society 2018). A ação traumática da migração e fixação das L5 de *D. immitis* nas artérias pulmonares, secreção de fatores tóxicos e desencadeamento de mecanismos imunitários resultam em endarterites proliferativas, que tornam rugoso o calibre da artéria, retêm os parasitas e culminam na oclusão do lúmen vascular (M.A. Taylor 2016; Carretón et al. 2017). Isto resulta em hipertensão pulmonar (Meireles et al. 2014) e aumento da pós-carga do ventrículo direito, culminando numa insuficiência cardíaca congestiva direita (Carretón et al. 2017), que gera frequentemente, congestão crónica do fígado e ascite (Meireles et al. 2014). A presença de nemátodes na veia cava pode provocar uma congestão hepática severa com trombose das várias veias hepáticas (M.A. Taylor 2016). A ocorrência de glomerulonefrites e proteinúria, como consequência da deposição de imunocomplexos circulantes, também está reportada (M.A. Taylor 2016). A morte dos parasitas, por causas naturais ou pós-terapêutica, em conjunto com a inflamação e agregação plaquetária resultam (M.A. Taylor 2016), muitas vezes, em tromboembolismo, enfarte pulmonar (M.A. Taylor 2016), obstrução arterial (Carretón et al. 2017) e isquémia miocárdica (Meireles et al. 2014). Ambas as espécies de *Dirofilaria* mantêm uma relação de endossimbiose com a bactéria *Wolbachia pipientis*. Esta bactéria modula a resposta imunitária do hospedeiro, permitindo a sobrevivência, desenvolvimento e reprodução do parasita (Meireles et al. 2014; Genchi and Kramer 2017).

3.6.5. Predisposição

A infecção por *Dirofilaria* spp. ocorre com uma percentagem 4 a 5 vezes superior em animais errantes e/ou com acesso ao exterior. Parece existir, também, uma maior prevalência em animais com idades entre os 3 e os 15 anos (Meireles et al. 2014). Está, também, reportada uma maior ocorrência de casos de *D. repens* em cães machos, de guarda, com vida no exterior e idosos. Estes dados sugerem a exposição ao vetor como o principal fator de risco de infecção (Capelli et al. 2018).

3.6.6. Saúde pública

D. immitis e *D. repens* são consideradas espécies zoonóticas (M.A. Taylor 2016; Genchi and Kramer 2017). A infecção no Homem ocorre, também, através da picada do vetor, pelo que a principal via de prevenção é o uso de repelentes no Homem, ambiente doméstico peri-doméstico e, indiretamente, no cão (Capelli et al. 2018).

D. immitis origina lesões circulares no pulmão, geralmente de reduzido significado clínico (M.A. Taylor 2016). Pode ocorrer tromboembolismo pulmonar por morte dos

nemátodes que se alojam deficientemente nas artérias pulmonares (Meireles et al. 2014). *D. repens* é o principal agente de dirofilariose humana na Europa (Maia, Lorentz, et al. 2015; Capelli et al. 2018). Aloja-se em nódulos subcutâneos e na conjuntiva ocular (M.A. Taylor 2016; Genchi and Kramer 2017). No Homem, esta espécie não atinge a maturação sexual (Genchi and Kramer 2017; Capelli et al. 2018) e muitas das larvas morrem rapidamente após a infeção do hospedeiro (Capelli et al. 2018), sendo a maioria das infeções assintomática (Genchi and Kramer 2017; Capelli et al. 2018). A manifestação clínica mais comum é o síndrome da larva migrante, com nódulos subcutâneos, prurido e eritema generalizados. Frequentemente, a larva atinge o olho humano, sendo visível na conjuntiva. A remoção cirúrgica da larva e dos nódulos subcutâneos é possível e constitui, efetivamente, o tratamento da patologia (Capelli et al. 2018). Menos comum, a localização no músculo, pulmão, cavidade abdominal ou dura mater pode originar febre, linfadenopatia, lesões pulmonares, tumorais e meningoencefalites (Capelli et al. 2018).

Na Europa, o número de infeções reportadas no Homem tem sido crescente (Capelli et al. 2018), sendo a prevalência de infeções por *D. repens* significativamente maior, quando comparadas com *D. immitis* (Genchi and Kramer 2017; Capelli et al. 2018). Fica, no entanto, a dúvida se esta aparente maior prevalência de *D. repens* se prende apenas com o facto dos sinais clínicos serem mais facilmente observados e reportados (Genchi and Kramer 2017). Em Portugal, há registo de três casos de infeção por *D. immitis* no Homem – uma infeção ocular e duas infeções pulmonares. O único caso de doença por *D. repens* parece ter sido, de facto, importado da Índia, pelo que não existem registos de infeção autóctone por *D. repens*, no Homem, em Portugal (Maia, Lorentz, et al. 2015).

3.7. Sinais clínicos, diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças transmitidas por flebótomos/mosquitos

De forma semelhante às doenças transmitidas por artrópodes, também o quadro clínico, diagnóstico, tratamento e prevenção das doenças transmitidas por flebótomos/mosquitos serão sintetizadas e descritas em simultâneo na tabela 2. Serão apenas abordados os aspetos referentes a *L. infantum* e *D. immitis* – espécies pesquisadas no âmbito do rastreio realizado na presente dissertação.

Tabela 2 - Principais aspetos do quadro clínico, diagnóstico, tratamento e prevenção das doenças transmitidas por flebótomos/mosquitos

	Sinais Clínicos	Diagnóstico	Tratamento	Prevenção
<i>L. infantum</i>	Leishmaniose cutânea (a pele é o principal órgão que regista alterações, mas ocorrem alterações macro e microscópicas no fígado, baço e linfonodos ^(a)): - Úlceras superficiais no lábio e/ou pálpebra ^(b;c;d) ; - Descamação ^(a) ; - Hiperqueratose ^(a) ; - Alopecia ^(a) ; - Pápulas ^(a) ; - Caquexia ^(a) ; - Apatia ^(a) ; - Linfadenomegália ^(a) ; Leishmaniose cutâneo visceral (forma clássica, multissistémica ^(a)): - Linfadenomegália ^(a) ; - Despigmentação nasal ^(a) ; - Ornicogribose ^(a) ; - Dermatite exfoliativa não prurítica ^(a) ; - Dermatite ulcerativa-erosiva ^(a) ; - Dermatite nodular, postular ou papular ^(a) ; - alopecia ^(a) ; Leishmaniose visceral: - Febre ^(c;e) ; - Anemia ^(c;e) ; - Anorexia ^(c;e) ; - Perda de peso ^(c;e) ; - Atrofia muscular ^(c;e) ; - Esplenomegália ^(c;e) ; - Hepatomegália ^(c;e) ; - Uveítes, queratites, poliartrites e glomerulonefrites por deposição de imunocomplexos ^(d;f) ; A doença renal pode ser a única manifestação clínica da doença e a sua evolução para doença renal crónica é a principal causa de morte ^(d) ;	Análises sanguíneas: - anemia moderada, não regenerativa, normocítica e normocrômica; - anemia hemolítica, macrocítica, hipocrômica e regenerativa (não comum) ^(d;f) ; - Neutrofilia ^(f) ; - Trombocitopenia ^(f) ; - Leucopenia ^(f) ; - Linfopenia (mau prognóstico) ^(f) ; - Eosinopenia ^(f) ; - Monocitose ^(f) ; - Hiperglobulinemia ^(d;f) ; - Hiper gamaglobulinemia ^(d;f) ; - Hiperproteinemia e hipoalbuminemia (mau prognóstico) ^(d;f) ; - Elevação das concentrações séricas dos parâmetros bioquímicos renais e hepáticos, com a progressão da doença ^(f) ; - Observação das formas amastigotas num esfregaço feito a partir de uma PAAF/biópsia de linfonodos, baço ou medula óssea, realizado por aposição de lesões cutâneas ^(c;d;g) ; - PCR e imunocitoquímica ^(c;g) (aspirados esplênicos e de medula óssea são amostras ideais); PCR em tempo real é o método de diagnóstico com maior sensibilidade ^(e;h) ; - Sorologia (ELISA, IFI, Western Blot ^(c;d)); IFI é o método sorológico de eleição em animais sem sinais clínicos; ELISA em animais com sinais clínicos ^(h) ; - Imunocromatografia (teste rápido) ^(d;e) ;	Cura parasitológica raramente conseguida; recidivas são frequentes ^(d) ; - Alopurinol (leishmanioestático), 10mg/kg, PO, BID, durante 6 meses no mínimo; combinado, inicialmente ^(d) , com um dos fármacos leishmanicidas; - Antimoniato de meglumina (leishmanicida), 100mg/kg, SC, SID, durante 3 a 4 semanas; nefrotóxico ^(c) ; - Miltefosina (leishmanicida): 2mg/kg, PO, SID, durante 4 semanas ^(h) ; - Anfotericina B: 0,5-0,8mg/kg, IV ou SC, 2-3x/semana, até obter concentração cumulativa de 15mg/kg ^(e) ; - Marbofloxacin: 2mg/kg, SID, durante 28 dias; seguro para a função renal ⁽ⁱ⁾ ; - Imunomodulação: domperidona ^(d)	Abordagem combinada de vacinação de cães com o uso contínuo de moléculas repelentes/inseticidas ^(j;l) : piretróides sob a forma de coleiras ou pipeta spot on ^(c;d;l) ; - Aplicação de barreiras físicas: redes mosquiteiras nas janelas de casa e canis ^(d;e;l) ; pulverizar ambiente doméstico e canis, incluindo redes mosquiteiras que os delimitam ^(l) ; - Evitar passeios à hora do crepúsculo; - Limitar a existência de microhabitats ricos em matéria orgânica; - Vacinação ^(j;g) - Imunomodulação (domperidona) ^(h) Animais diagnosticados, mesmo que após conclusão do tratamento, é fundamental manter o uso de pipetas e/ou coleiras antiparasitárias, uma vez que a cura parasitológica é raramente atingida e, portanto, os animais continuam a ser uma fonte de infeção para animais saudáveis e Homem ^(d;h) .

(a)(Oliveira et al. 2019);(b)(Iborra et al. 2018);(c)(M.A. Taylor 2016);(d)(Ribeiro et al. 2018); (e)(Duthie et al. 2018);(f)(Maia and Campino 2018);(g)(Zajac and Conboy 2012);(h)(Travi et al. 2018);(i)(Pineda et al. 2017);(j)(Fernández Cotrina et al. 2018);(l)(Gálvez et al. 2018)

Sinais clínicos	Diagnóstico	Tratamento (em pormenor no Anexo 1)	Prevenção
Parasitas adultos (<5): alojam-se nas artérias lobares e artéria pulmonar; animais geralmente sem sinais clínicos ^(m,n) ;	- Imunocromatografia ^(m,n) ; - ELISA ^(m,n) ; - PCR ^(o) ; - Observação de um esfregaço sanguíneo ^(m,n) (idealmente a colheita é feita ao anoitecer, período de maior atividade das microfilárias ⁽ⁿ⁾); a microfilária de D. immitis apresenta cabeça afilada e um corpo e cauda finos e retos. Quando usada a fosfatase ácida, cora de vermelho em vários pontos em redor do poro anal e excretor ^(m,r) ; deve ser usada técnica de concentração – Knott test ^(m,n) ;	Nemátodes adultos e microfilárias têm diferentes susceptibilidades ^(o) - Melarsomina (fármaco adulcida aprovado pela FDA): três injeções de 2,5mg/kg, IM (1ª e 2ª injeção separadas por um mês; 2ª e 3ª separadas por 24h) ⁽ⁿ⁾ ; - Administração mensal de doses preventivas de lactonas macrocíclicas ^(n,s) ; administração mensal de ivermectina, a longo prazo, parece ter efeito adulcida (são necessários 36 meses até eliminação total de D. immitis) ⁽ⁿ⁾ ; - Administração de uma lactona macrocíclica dois meses antes da administração de melarsomina, garante a eliminação de larvas suscetíveis e permite a maturação de nemátodes jovens tornando-o suscetíveis à melarsomina ^(u) ; - Moxidectina tópica (fármaco microfilaricida aprovado pela FDA) ⁽ⁿ⁾ ; - Remoção cirúrgica dos parasitas adultos alojados na artéria pulmonar, câmaras cardíacas direitas, valva tricúspide e veia cava posterior ^(n,s) ; no síndrome da veia cava, a morte ocorre em 2-3 dias, se a remoção cirúrgica dos parasitas não for realizada ^(n,q) ;	- Eliminar reservatórios com águas paradas propícios ao desenvolvimento de mosquitos (vasilhas, tanques de rega destapados); - Uso de ventoinhas (perturbar padrão voador do mosquito) ⁽ⁿ⁾ ; - Utilização de armadilhas físicas ⁽ⁿ⁾ ; - Evitar atividades ao ar livre no crepúsculo (período de maior atividade do inseto) ⁽ⁿ⁾ ; - Pulverizar o ambiente com sprays inseticidas ⁽ⁿ⁾ ; - Uso tópico de compostos repelentes/ inseticidas à base de piretróides ⁽ⁿ⁾ ; - Administração de fármacos profiláticos (lactonas macrocíclicas – ivermectina, moxidectina, salamectina, milbecima ^(m,n,q,u) ; atividade contra microfilárias, L3 e L4, e, quando usadas de forma contínua têm ação nos estádios adultos ^(n,q))
Parasitas adultos (>40): deslocação retrógrada desde a artéria pulmonar até à veia cava – síndrome da veia cava ⁽ⁿ⁾ ; - Hemólise ^(m,p) ; - Hemoglobínúria ^(o,p) ; - Bilirrubinémia ^(o,p) ; - Congestão hepática/ icterícia ^(n,q) ; - Pulso jugular ^(n,q) ; - Dispneia ^(o,p) ; - Choque ^(o,p) ;	- Radiografia torácica: confirmação do diagnóstico, estadiamento da doença cardio-pulmonar e prognóstico ⁽ⁿ⁾ ; dilatação e contorno turtoso dos ramos da artéria pulmonar ^(n,o) ; em casos mais severos, dilatação cardíaca direita com a típica forma de “D” invertido ⁽ⁿ⁾ ; - Ecocardiografia: confirmação da doença e avaliação dos danos anatómicos; em animais com hemoglobinúria, a observação dos adultos no orifício da valva tricúspide e veia cava posterior, confirma diagnóstico de síndrome da veia cava ^(m,n,q) ;	Medicação de suporte: - Corticoesteróides em doses anti-inflamatórias ^(n,q) ; - Anti-histamínicos ⁽ⁿ⁾ ; - Doxiciclina (10mg/kg, BID, durante 4 semanas ^(n,t)); pela relação de simbiose com Wolbachia pipientis ⁽ⁿ⁾ , redução de L3 e L4, sinais clínicos, mortalidade ^(n,u) e complicações pós- tratamento ^(t) ; - Restrição de exercício até 8 semanas após última injeção de melarsomina ⁽ⁿ⁾ ;	

(m)(Meireles et al. 2014);(n)(A.H.Society 2018);(o)(M.A. Taylor 2016);(p)(Nelson 2015);(q)(McCall et al. 2004);(r)(Little et al. 2018);(s)(Bowman and Drake 2017);(t)(Nelson et al. 2017); (u)(Dixon-Jimenez et al. 2018)

4. Estudo dos fatores de risco associados à infeção por *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp, *Leishmania* spp. e *Dirofilaria* spp. em cães do Alentejo norte – Portugal

4.1. Objetivos

O estudo epidemiológico realizado na presente dissertação teve como principais objetivos:

- (1) Estimar a prevalência de *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp., *Babesia* spp., *Leishmania* spp. e *Dirofilaria* spp. na população de cães residente na região interior norte do Alentejo através da observação direta de esfregaços sanguíneos e sorologia (ELISA e IFI).
- (2) Avaliar potenciais fatores de risco – características individuais e hábitos de vida/profilaxia de cada animal – associados à ocorrência de cada um dos agentes, através da realização de um inquérito aos tutores.

Por ser uma área onde escasseiam dados sobre a problemática em questão, o presente estudo visa, sobretudo, um melhor conhecimento do panorama parasitológico da região e, conseqüentemente, a criação de ferramentas úteis para futuras avaliações de risco e implementação de medidas de deteção, controlo e terapêutica ajustadas à realidade.

4.2. Materiais e métodos

4.2.1. Caracterização geográfica e climática da área de estudo

A designação de Alentejo norte inclui o distrito de Évora e Portalegre. O distrito de Évora estende-se por uma área de 7 393, 46 km² (Direção Geral do Território 2018), com uma população residente de 166 726 habitantes (Instituto Nacional de Estatística 2012). É constituído por catorze concelhos, a saber: Alandroal, Arraiolos, Borba, Estremoz, Évora, Montemor-o-Novo, Mora, Mourão, Portel, Redondo, Reguengos de Monsaraz, Vendas Novas, Viana do Alentejo e Vila Viçosa (Centro de Informação Geoespacial do Exército 2013). O distrito de Portalegre ocupa uma área de 6 084,34 km² (Direção Geral do Território 2018). Residem neste distrito cerca de 118 506 habitantes (Instituto Nacional de Estatística 2012), que se distribuem pelos quinze concelhos existentes: Alter do Chão, Arronches, Avis, Campo Maior, Castelo de Vide, Crato, Elvas, Fronteira, Gavião, Marvão, Monforte, Nisa, Ponte de Sor, Portalegre e Sousel (Centro de Informação Geoespacial do Exército 2013).

Segundo a classificação de Koppen, a área de estudo é abrangida por clima temperado com inverno chuvoso e verão seco e quente. A temperatura média anual situa-se entre os 15,1°C e os 17°C. A precipitação acumulada anual varia entre <600mm e 800mm (IPMA 2017). A região é caracterizada por uma simbiose de áreas urbanas e rurais, com os animais a frequentarem ambos os ambientes. A prática da caça é uma atividade comum,

sendo bastante frequente os cães que têm como aptidão a caça. A época venatória ocupa todo o ano, variando as espécies autorizadas em cada mês (ICNF 2018).

O estudo aqui apresentado foi realizado no período que decorreu entre 11 de Setembro de 2018 a 11 de Janeiro de 2019. Foram incluídos 102 cães sediados em vários concelhos da zona norte do Alentejo. No total, estão representados sete dos catorze concelhos pertencentes ao distrito de Évora – Alandroal (n=12), Arraiolos (n=4), Borba (n=18), Estremoz (n=42), Évora (n=1), Redondo (n=1) e Vila Viçosa (n=2) – e três dos quinze concelhos pertencentes ao distrito de Portalegre – Elvas (n=16), Fronteira (n=2) e Sousel (n=4) – numa extensão de 4916 km² (Fig. 4). No período temporal em que decorreu a colheita de amostras, a temperatura oscilou, em média, entre os 3,5°C e os 33,5°C no distrito de Évora (Gráfico 1) e situou-se entre os 6,4°C e os 30,9°C no distrito de Portalegre (Gráfico 2). A precipitação oscilou entre os 5,4mm e os 105,6mm no distrito de Évora (Gráfico 1). No distrito de Portalegre registou-se o valor mínimo de 12,9 mm e o máximo de 161,9 mm (Gráfico 2). A intensidade máxima de vento foi registada em Dezembro, com 76,7km/h no distrito de Évora e de 88,6km/h em Portalegre (IPMA 2018).

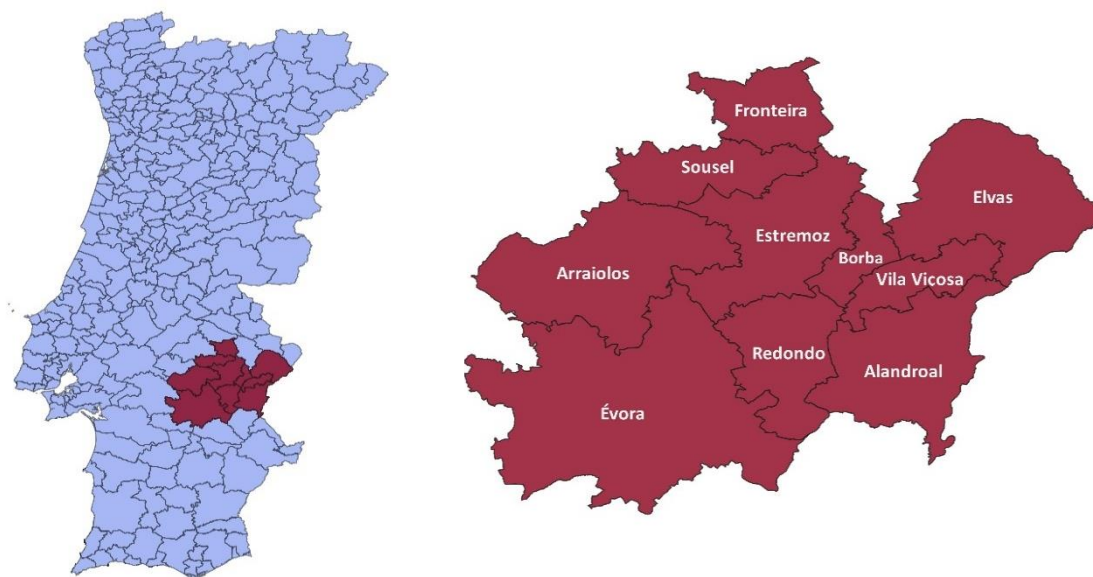


Figura 4 – Área de estudo do trabalho experimental. À direita, a área de estudo aparece contextualizada no panorama nacional. À esquerda, em detalhe, estão identificados os dez concelhos que constituíram a área de estudo, numa extensão de 4916km² (Original)

Gráfico 1 - Evolução da temperatura e precipitação médias diárias no distrito de Évora. O período durante o qual decorreu o estudo – Setembro, 2018 a Outubro, 2019 – encontra-se sombreado e destacado no gráfico (Fonte de dados: National Centers for Environmental Information).

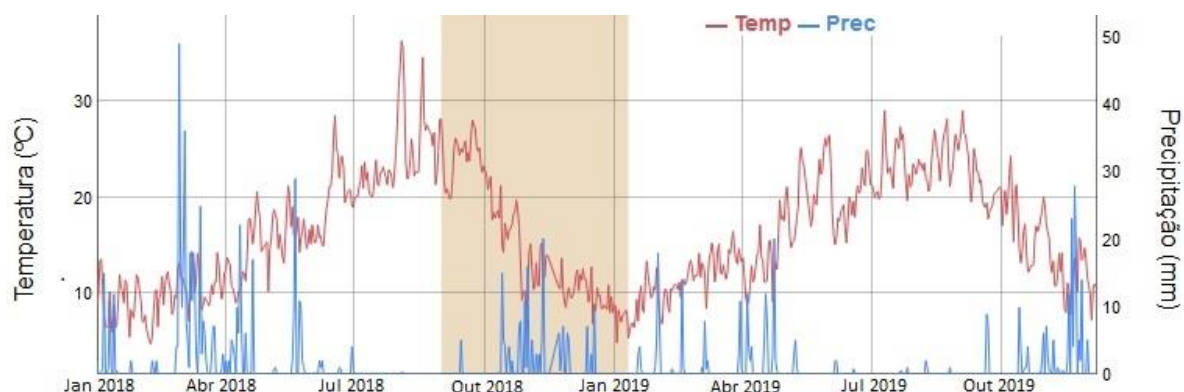
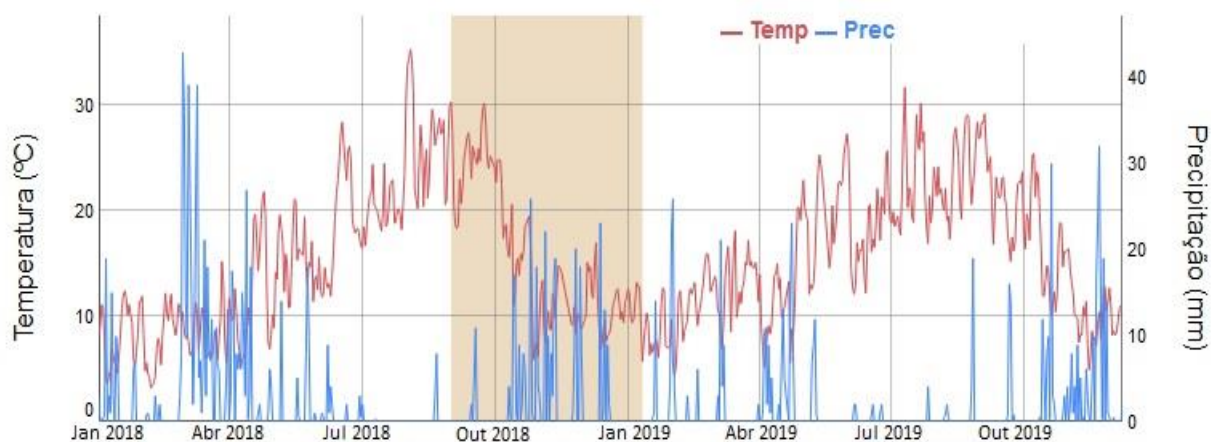


Gráfico 2 - Evolução da temperatura e precipitação médias diárias no distrito de Portalegre. O período durante o qual decorreu o estudo – Setembro, 2018 a Outubro, 2019 – encontra-se sombreado e destacado no gráfico (Fonte de dados: National Centers for Environmental Information).



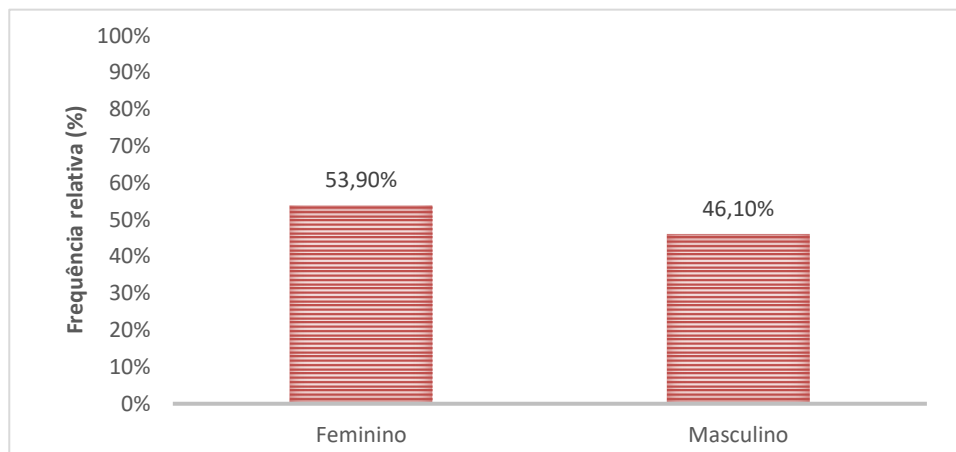
4.2.2. Caracterização da população em estudo

A população em estudo foi constituída por 102 cães que se apresentaram no CVEEV para profilaxia, consulta, realização de exames complementares de diagnóstico ou cirurgia. A amostragem foi obtida independentemente de sexo, idade, raça ou estado clínico, apenas por conveniência em termos de gestão de tempo e atividades que ocorriam na clínica no momento da colheita. Os tutores foram previamente informados dos objetivos do estudo e dos procedimentos necessários para incluir o seu animal como parte da amostra. Os animais

foram apenas incluídos após obtenção de consentimento escrito por parte dos tutores, garantido a proteção dos dados pessoais dos mesmos.

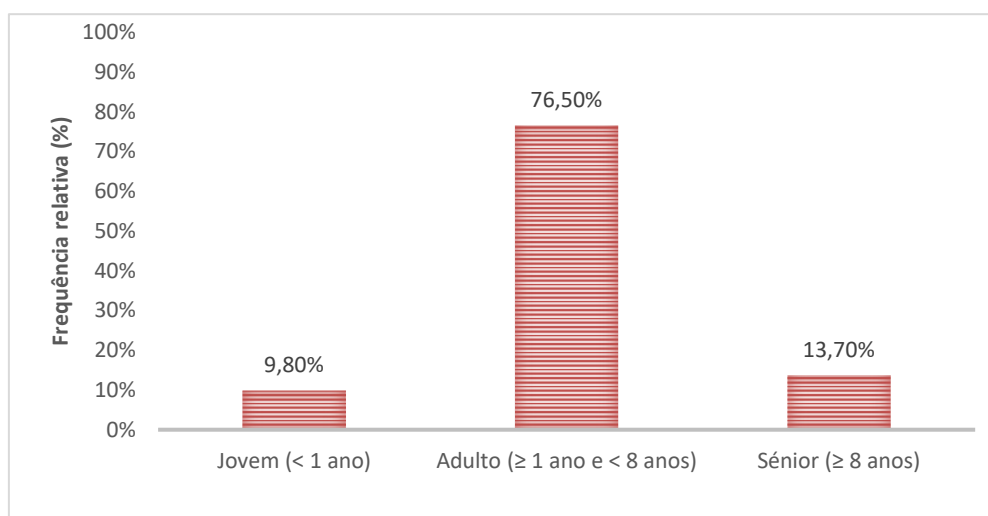
Dos 102 cães que constituem a amostra, 55 (53,9%) pertencem ao sexo feminino e 47 (46,1%) pertencem ao sexo masculino (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Frequência relativa (%) da distribuição de sexo dos cães incluídos na amostra.



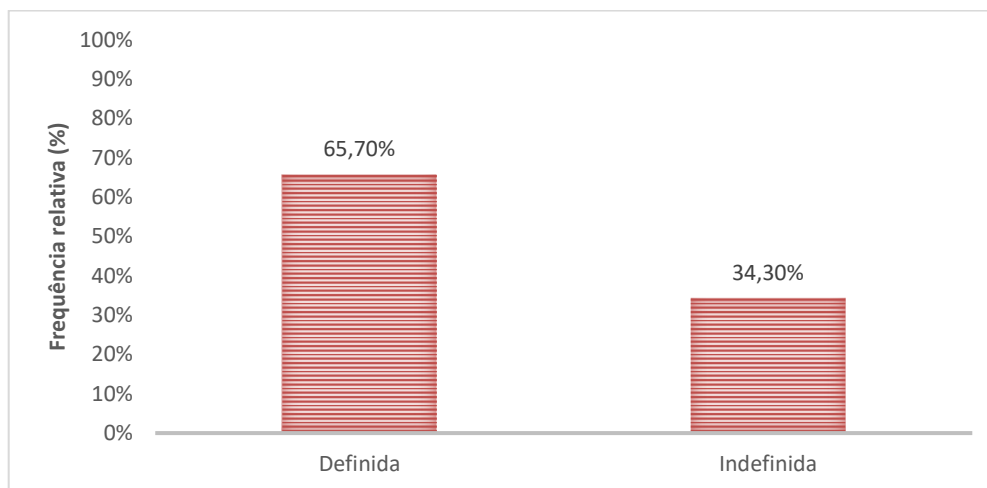
Relativamente à idade e, de modo a facilitar a análise estatística, os animais foram divididos em classes: Jovem (<1 ano), Adulto (≥ 1 ano e <8 anos) e Sênior (≥ 8 anos). No total da amostra foram incluídos 10 animais jovens (9,8%), 78 adultos (76,5%) e 14 sêniores (13,7%) – (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Frequência relativa (%) da distribuição de idade dos cães incluídos na amostra.



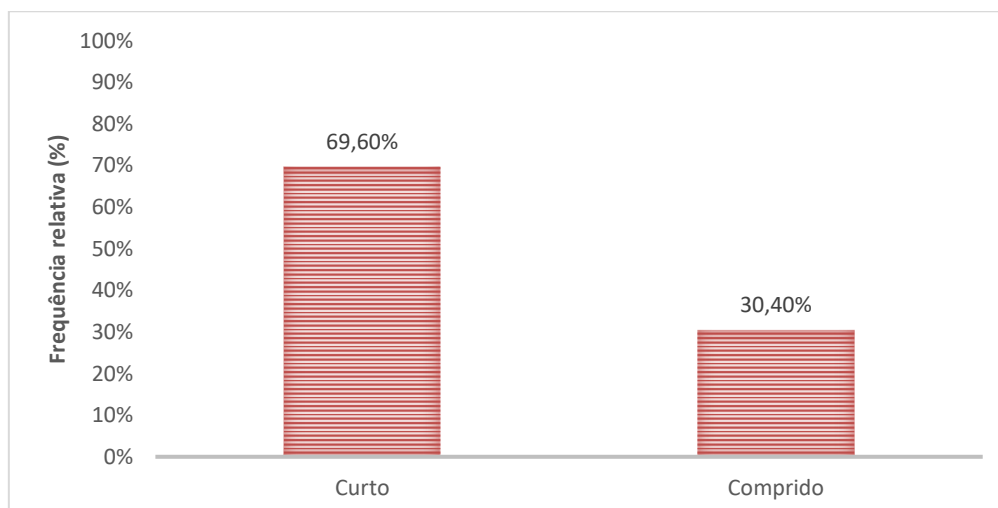
A população de cães amostrados incluía animais de 24 raças diferentes, além de animais sem raça definida. Também para facilitar o tratamento estatístico de dados, os cães foram agrupados em animais de raça definida e animais de raça indefinida. Assim sendo, a maioria dos animais apresenta raça definida – 67 animais (65,7%) –, contrariamente aos 35 animais (34,3%) que apresentam raça indefinida (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Frequência relativa (%) da distribuição de raça dos cães incluídos na amostra.



Em relação ao comprimento do pêlo, os animais foram divididos em animais de pêlo curto e animais de pêlo longo (tendo os animais de pêlo médio sido considerados nesta última categoria). No total, a amostra incluiu 71 (69,6%) animais de pêlo curto e 31 (30,4%) animais de pêlo longo (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Frequência relativa (%) da distribuição do comprimento do pêlo dos cães incluídos na amostra.



Os animais foram sujeitos a um exame de estado geral e à pesquisa de ixodídeos fixados no seu corpo (as localizações preferenciais estão ilustradas na Figura 5). Foi realizado, simultaneamente, o preenchimento de um inquérito aos tutores de cada animal de modo a recolher informações sobre a proveniência, aptidão e hábitos de vida de cada animal.

4.2.3. Colheita das amostras e processamento

Cada animal foi sujeito à punção dos capilares sanguíneos da orelha de modo a obter uma gota de sangue para a realização de dois esfregaços sanguíneos. Simultaneamente foi realizada a colheita de 2 ml de sangue periférico, tendo sido a veia cefálica ou jugular as localizações preferenciais. Este sangue foi conservado num tubo seco, sujeito a centrifugação durante 10 minutos para obtenção do soro. Cada soro foi, posteriormente, extraído e transferido para novo tubo seco, identificado, congelado a -20°C e armazenado nas instalações do CVEVV até ser transportado para o Institute of Parasitology – University of Bern (IPUB), na Suíça, para a realização de ELISA e IFI na pesquisa de anticorpos contra os agentes em estudo.

4.2.4. Métodos laboratoriais

4.2.4.1. Esfregaços sanguíneos

Os esfregaços foram realizados nas instalações do CVEVV. Após a identificação da lâmina com o nome do animal e o respetivo número do inquérito associado, foi feita a punção dos vasos capilares da orelha de modo a obter uma gota de sangue periférico. Esta gota foi colocada na lâmina, sendo a sua distribuição assegurada com o auxílio de outra lâmina, de modo a deixar uma camada de sangue o mais fina possível. As lâminas foram deixadas a secar à temperatura ambiente, sendo posteriormente acondicionadas em papel absorvente e transportadas até ao Laboratório de Parasitologia Vítor Caeiro, da Universidade de Évora, onde foi realizada a sua fixação, coloração e observação.

Inicialmente foi fixada e corada apenas uma lâmina de cada animal. Após a observação da mesma, caso esta se mostrasse inconclusiva ou revelasse uma forte suspeita de hemoparasitas, procedia-se, então, à fixação e coloração da segunda lâmina do mesmo animal para nova observação e conclusão. Nos casos em que o segundo esfregaço se revelava igualmente inconclusivo, o resultado da observação dos esfregaços desse animal era registado como inconclusivo. Se após observação da segunda lâmina fosse possível concluir uma suspeita ou não de hemoparasitas, então era registado apenas o resultado da observação da segunda lâmina. A coloração utilizada foi a coloração de Giemsa, segundo o protocolo utilizado no laboratório de parasitologia Vítor Caeiro. Após a fixação com álcool metílico durante 5 minutos, cada lâmina era deixada a secar à temperatura ambiente.

Posteriormente, era adicionado o corante de Giemsa diluído durante 15 a 20 minutos. Após conclusão deste período de tempo, procedia-se à lavagem das lâminas com água destilada neutralizada, com o cuidado de não verter o corante, deixando-as a secar naturalmente até à sua observação.

A observação microscópica dos esfregaços foi realizada com as ampliações de 400x e 1000x, com início na periferia de cada esfregaço. Foram observados 40 campos aleatórios de cada esfregaço na tentativa de garantir que todas as lâminas eram observadas com o mesmo rigor.

4.2.4.2. Sorologia

4.2.4.2.1. Pesquisa de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* e anti-*E. canis* através de ELISA

A pesquisa de anticorpos contra *A. phagocytophilum* e *E. canis* foi realizada no IPUB, Suíça. Foram utilizados kits de diagnóstico comercializados pelos laboratórios Megacor® e os testes foram realizados de acordo com as normas indicativas do fabricante. Estes kits utilizam o método de ELISA para pesquisa de anticorpos (IgG) numa amostra através da interação específica antígeno-anticorpo.

Foram utilizados antígenos específicos de *A. phagocytophilum* e *E. canis* nos vários poços de cada placa de ELISA. As amostras de soro dos 102 cães em análise foram previamente diluídas com a solução tampão e, posteriormente, distribuídas por cada poço individual de modo a permitir a reação de ligação antígeno-anticorpo. As placas sofrem uma primeira incubação à temperatura ambiente (20-25°C), seguindo-se também uma primeira lavagem. Posteriormente, é adicionado o conjugado específico (um anticorpo IgG anti-canino, ligado à enzima HRP) e a placa é submetida a uma segunda incubação à temperatura ambiente. Os complexos antígeno-anticorpo ligam-se, assim, ao conjugado, sendo necessária uma segunda lavagem para eliminar o conjugado não ligado. Adicionou-se, de seguida, o substrato TMB que altera a cor da solução dos poços com resultado positivo para azul. A adição da solução de STOP, constituída por ácido sulfúrico, consiste no último passo e determina a mudança da cor azul para amarela. A extinção da cor azul é diretamente proporcional ao número de IgG presentes na amostra em teste, para cada agente. A observação de cada poço deve ser sempre realizada num espectrofotómetro com medição do comprimento de onda a 450 nm.

Após calcular o valor cut-off, considera-se um resultado positivo se a redução da intensidade da luz emitida for acima de 10% do valor de cut-off. É considerado negativo se a redução da intensidade da luz emitida for abaixo de 10% do valor de cut-off. É um resultado duvidoso, caso se situe no intervalo entre ambos. O procedimento foi sempre realizado e

avaliado pelo mesmo operador, verificando um resultado positivo, negativo ou duvidoso sempre de acordo com o controlo negativo e positivo como forma de diminuir eventuais erros.

4.2.4.2.2. Pesquisa de anticorpos anti-*L. infantum* através de ELISA

A pesquisa de anticorpos anti-*L. infantum* foi, igualmente, realizada no IPUB, Suíça, com recurso ao método de ELISA.

Os poços de cada placa foram revestidos com 50µL de antígeno solúvel de *L. infantum*, sofrendo a primeira incubação a 4°C, durante 24h. Posteriormente, o sobrenadante é eliminado e é feita a saturação da placa com 50µL de solução de diluição, constituída por PBS, monolaurato de polioxietilenosorbitano e hemoglobina de bovino. A placa sofre a segunda incubação a 37°C, durante 30 minutos. O soro de cada animal, diluído na razão de 1:100 com a solução de diluição, é adicionado a cada poço na quantidade de 100µL. A placa sofre a terceira incubação a 37°C, durante 45 minutos. Após esta, procede-se a 3 lavagens da placa com 200µL a solução de lavagem, adicionando depois 100 µL do conjugado específico (um anticorpo IgG anti-canino, previamente diluído na solução de diluição na razão de 1:6000). A placa é incubada pela quarta vez a 37°C, durante 30 minutos. Os poços são novamente lavados 3 vezes (com 200µL da solução de lavagem), sendo aplicados 100 µL de substrato a cada um deles. A placa sofre a última incubação a 37°C. A leitura da placa é realizada num espectrofotómetro a 405nm, aos 5 min., 10 min. e 30 min.

4.2.4.2.3. Pesquisa de antígeno de *D. immitis* através de ELISA

A pesquisa de antígenos de *D. immitis* foi realizada no IPUB, Suíça. Foram utilizados kits de diagnóstico comercializados pelos laboratórios Zoetis® e os testes foram realizados de acordo com as normas indicativas do fabricante. Estes kits utilizam, também, o método de ELISA, neste caso para pesquisa de antígenos de *D. immitis* através da interação específica antígeno-anticorpo.

Foram utilizados anticorpos anti-*D. immitis* nos vários poços de cada placa de ELISA. Com o auxílio de uma pipeta, foram posteriormente adicionados 50 µL de soro de cada animal, em cada um dos poços da placa. Em seguida, foi adicionada uma gota de conjugado (um anticorpo específico ligado à HRP), em cada um dos poços previamente preenchidos com a amostra, procedendo à homogeneização da mistura durante 15 segundos através da agitação ligeira do suporte. A placa sofre a primeira incubação, à temperatura de 20-25°C, durante 10 minutos. Procede-se à eliminação do fluido de cada poço, invertendo o suporte; posteriormente, cada poço sofreu uma lavagem com água destilada, sendo o fluido de cada poço constantemente eliminado. Este processo de lavagem da placa foi repetido cinco vezes, finalizando com a remoção do fluido de cada poço através da inversão do suporte. Foram adicionadas duas gotas de tampão de substrato cromogénico em cada poço, procedendo à

homogeneização da mistura durante 15 segundos através da agitação ligeira do suporte. A placa sofre a segunda e última incubação, a 20-25°C, durante 5 minutos. Os resultados foram lidos imediatamente após término deste período.

Qualquer antígeno presente na amostra liga-se ao anticorpo anti-*D. immitis* que reveste cada um dos poços ou liga-se ao anticorpo do conjugado, formando um complexo específico. Qualquer anticorpo ligado à enzima é removido, através das lavagens dos poços. Quando é adicionado o substrato cromogénico, a observação da cor de cada poço confirma o resultado: a não alteração de cor (cor transparente) indica que o antígeno de *D. immitis* não está presente; o desenvolvimento de uma coloração azul indica especificamente um resultado positivo, isto é, a presença do antígeno de *D. immitis*. O procedimento foi sempre realizado e avaliado pelo mesmo operador, verificando um resultado positivo, negativo ou duvidoso sempre de acordo com o controlo negativo e positivo como forma de diminuir eventuais erros.

4.2.4.2.4. Pesquisa de anticorpos anti-*B.canis* através de IFI

A pesquisa de anticorpos anti-*B.canis* foi, também, realizada no IPUB, Suíça. Para a pesquisa de anticorpos anti-*B. canis* foram utilizadas lâminas revestidas com eritrócitos de cão parasitados com *B. canis*, preparadas e congeladas no laboratório. Após descongelar as lâminas, o soro de cada animal a ser testado foi diluído a 1:40 (5 µL de soro + 195 µL de PBS). Foram adicionados 12 µL de diluição de soro de cada animal a testar a cada poço, inclusive ao poço do controlo positivo e ao poço do controlo negativo. A lâmina sofre a primeira incubação a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente, cada lâmina foi lavada com água destilada durante 5 minutos, sobre uma placa com agitação magnética. Este procedimento foi repetido três vezes. Foi, então, aplicado o conjugado anti-cão marcado com FITC (diluído a 1:300 em PBS com 1% de soro de cavalo), submetendo a lâmina a uma segunda incubação a 37°C, durante 30 minutos. São realizadas, novamente, três lavagens, com a duração de 5 minutos cada, sobre placa em agitação. A lâmina fica a secar à temperatura ambiente. Depois de seca, aplicou-se o líquido de montagem e a lamela, procedendo-se à observação ao microscópio de fluorescência, com a objetiva de 40X. Os poços nos quais foi possível identificar *Babesia* que emitiam fluorescência, na titulação de 1:40, eram considerados positivos para a presença de anticorpos anti-*B.canis*. Não existe, até ao momento, antígeno universal que possa ser usado para pesquisa de todas as espécies de *Babesia* spp. que infetam o cão – o mais usado é o de *B. canis*, não distinguindo as diferentes subespécies (Solano-Gallego et al., 2016).

4.2.5. Inquéritos

Com o objetivo de recolher informações sobre características individuais e hábitos de vida que pudessem constituir possíveis fatores de risco na infeção pelos agentes infecciosos em estudo, foi elaborado um inquérito a ser respondido pelos tutores de cada animal incluído na amostra (Anexo 2 e 3). Este inquérito estava sub-dividido em três secções. Numa primeira secção eram recolhidas informações sobre as características físicas do animal (idade, sexo, raça, comprimento do pêlo) e a sua localização habitacional. Na segunda secção, as perguntas incidiam, sobretudo, na proveniência e aptidão do animal além dos hábitos de profilaxia e hábitos de vida do animal – contacto com outras espécies, acesso ao exterior, contacto com ambiente rural, historial do doença dermatológica ou de diagnóstico por hemoparasitas, entre outros. Por fim, na terceira e última secção do inquérito eram registados dados considerados relevantes sobre o exame físico geral de cada paciente e a pesquisa de artrópodes fixados no seu corpo.

O inquérito era constituído por 35 perguntas de resposta curta e/ou múltipla. Antes da sua aplicação no contexto do presente estudo, procedeu-se à testagem do mesmo junto de três médicos veterinários e três enfermeiras veterinárias, todos eles tutores de cães. Serviu isto para simular a adequação e conhecer as limitações do inquérito face aos objetivos pretendidos, tendo sido realizadas posteriores correções a partir desta testagem. Concluída esta etapa, o inquérito foi impresso e realizado aos tutores no momento da colheita de sangue para esfregaço e sorologia. As perguntas foram colocadas pela autora que fazia, simultaneamente, o registo das respostas. Desta forma, foram esclarecidas no momento todas as dúvidas que pudessem existir na interpretação das perguntas, garantindo também a obtenção de respostas claras em relação ao pretendido. As questões sobre o protocolo vacinal de *B. canis* e *L. infantum* foram, igualmente, verificadas pela autora da dissertação através da consulta do boletim sanitário do animal em questão. Este inquérito incidia, inicialmente, sobre agentes transmitidos por ixodídeos. Após inclusão de *Leishmania* spp. e *Dirofilaria* spp. no rastreio – fase posterior à colheita de amostras e realização de inquérito – foram efetuadas chamadas telefónicas aos tutores dos animais amostrados para abordagem de questões relacionadas com agentes transmitidos por flebótomos/mosquitos. As questões adicionadas foram: “O animal pernoita em ambiente interior?”, “Utiliza repelente de mosquitos/flebótomos? Se sim, qual? Em que meses do ano é aplicado?”, “Vacinado contra a Leishmaniose canina? Qual a vacina?”, “O local onde o animal se encontra é ventoso?”, “Apercebe-se da existência de mosquitos?”.

4.2.6. Análise estatística

Todos os dados extraídos a partir dos inquéritos, além dos resultados das análises sorológicas e da observação dos esfregaços sanguíneos foram registados através do programa Microsoft Office Excel 2010. O tratamento estatístico foi conseguido através da plataforma de cálculo Epitools e R. Através da primeira plataforma foram calculadas as prevalências reais e aparentes dos agentes em estudo com intervalos de confiança de 95%, segundo os limites de Blaker (Brown et al. 2001). Para este cálculo foram tidas em consideração as sensibilidades e especificidades do método de diagnóstico utilizado para cada agente, podendo, assim, ajustar as prevalências calculadas. O kit utilizado para pesquisa de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* apresenta uma sensibilidade de 96% e especificidade de 92%. Já o kit utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* tem uma sensibilidade de 95,7% e especificidade de 97,9%. O kit utilizado para a pesquisa de antígeno de *D. immitis* tem sensibilidade e especificidade de 100%. A técnica de ELISA utilizada para a pesquisa de anticorpos anti-*L. infantum* tem uma sensibilidade e especificidade de 98%. A técnica de IFI para pesquisa de anticorpos anti-*B. canis* tem sensibilidade e especificidade de 100%.

A análise descritiva e inferencial foi realizada com recurso ao software R Commander, sendo constituída por duas fases. Inicialmente, a seroprevalência de cada agente foi analisada em função de cada variável individual referente às características do animal e respetivo estilo de vida. Foram elaboradas tabelas de contingência, sendo posteriormente empregue o Teste de Qui-quadrado e Teste Exacto de Fisher com um nível de significância assumido de $p < 0,05$ para um intervalo de confiança de 95%.

Na fase posterior foram seleccionadas todas as variáveis que, para cada agente, assumiam $p < 0,20$. Importa ressaltar que nesta seleção foram excluídas aquelas que, embora $p < 0,20$, não eram consideradas biologicamente plausíveis. As variáveis seleccionadas integraram, assim, uma análise de regressão logística de modo a permitir uma análise multivariada, averiguando os potenciais fatores de risco associados à seroprevalência de cada agente. Os *odds ratio* (OR) foram estimados para cada modelo de regressão logística realizado. Na análise de regressão logística, foram excluídos os agentes para os quais, na análise sorológica, não existiu nenhum animal positivo e/ou existiu um número muito reduzido de animais positivos.

Embora não constituísse objetivo inicial do presente estudo avaliar a concordância entre os testes rápidos de imunocromatografia realizados em clínica e a análise sorológica realizada em laboratório, foram identificados alguns casos em que, casualmente, foram utilizados os dois métodos de diagnóstico e registados ambos os resultados. Por se considerar um parâmetro interessante foi, então, analisada a concordância entre ambos os métodos através do teste de concordância de kappa de Cohen.

4.2.7. Análise espacial

Na realização dos inquéritos, foi possível registrar a morada completa de cada animal incluído no estudo. Estas moradas foram, posteriormente, convertidas em coordenadas geográficas que, com recurso ao software Qgis, permitiram a elaboração de mapas com a localização de casos positivos e negativos, possibilitando o estudo e análise de possíveis padrões de distribuição (zonas rurais, peri-urbanas e urbanas) de cada agente.

4.3. Resultados

4.3.1. Resultados laboratoriais

4.3.1.1. Detecção de hemoparasitas em esfregaços sanguíneos

Apenas 22 (21,2%) dos 102 esfregaços observados revelaram uma forte suspeita de hemoparasita. A grande maioria – 76 (74,5%) – não evidenciou a presença de hemoparasitas nos campos observados. Os restantes 4 (3,9%) foram considerados inconclusivos, por má técnica na elaboração do esfregaço ou na sua fixação/coloração.

4.3.1.2. Sorologia

A pesquisa de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* foi realizada com recurso a ELISA. Nenhum dos animais incluídos no presente estudo se revelou positivo. No entanto, 3 (2,9%) animais foram considerados duvidosos relativamente à presença de anticorpos contra este agente (Tabela 3).

A detecção de anticorpos contra *E. canis* foi, também, realizada através de ELISA, tendo sido detetados 24 (22,9%) animais positivos (Tabela 3).

Na sorologia para *B. canis*, com recurso a IFI, foram detetados 27 (26,5%) animais em que houve confirmação da presença de anticorpos contra este agente (Tabela 3). No entanto, ressalva-se que dois destes casos positivos (7,4%) são vacinados contra *B. canis* e, considerando que a análise sorológica tem como limitação a não distinção entre anticorpos vacinais e anticorpos naturalmente produzidos pelo indivíduo após infeção, não pode ser, assim, garantido que este valor de seroprevalência de 26,5% corresponda apenas a animais que contactaram com o agente de forma natural. A vacinação de cães contra *B. canis* não constituiu um critério de exclusão, uma vez que um (33,3%) dos três animais vacinados foi negativo na análise de sorologia realizada para pesquisa de anticorpos anti-*B.canis*.

Relativamente a *L. infantum*, com recurso a ELISA, foram diagnosticados 35 (33,7%) animais positivos na pesquisa de anticorpos contra este agente (Tabela 3). Do mesmo modo, é importante referir que dez destes casos positivos (28,6%) são animais que estão vacinados contra *L. Infantum*, pelo que não é possível garantir que os anticorpos detetados na análise sorológica sejam, efetivamente, anticorpos naturais produzidos pelo organismo após infeção

pelo agente. A vacinação de cães contra *L. infantum* não constituiu, igualmente, um critério de exclusão, uma vez que oito (44,4%) dos dezoito animais vacinados foram negativos na análise de sorologia para pesquisa de anticorpos anti-*L. infantum*.

Na pesquisa de antígeno de *D. immitis* apenas 1 (0,98%) dos animais sujeitos a rastreio foi considerado positivo (Tabela 3).

Tabela 3 - Prevalência dos hemoparasitas em estudo, calculada segundo os limites de Blaker

Agente		Prevalência aparente (Wilson)	Prevalência real (Blaker)
<i>A. phagocytophilum</i>	Estimado	0%	----
	95% I.C.	[0%; 3,6%]	----
<i>E. canis</i>	Estimado	23,5%	22,9%
	95% I.C.	[16,4%;32,6%]	[15,2%;32,6%]
<i>B. canis</i>	Estimado	26,5%	26,5%
	95% I.C.	[18,9%;35,8%]	[18,9%;35,8%]
<i>L. Infantum</i>	Estimado	34,3%	33,7%
	95% I.C.	[25,8%; 44%]	[24,8%; 43,7%]
<i>D. immitis</i>	Estimado	0,98%	0,98%
	95% I.C.	[0,17%; 5,4%]	[0,05%; 5,4%]

4.3.2. Inquéritos

4.3.2.2. Localização dos artrópodes

Apenas 5 (4,9%) animais incluídos no presente estudo tinham ixodídeos fixados no corpo, descobertos no momento do exame físico que antecedia a colheita de sangue para realização de esfregaço e análise sorológica.

Para cada um destes animais foi identificada a zona corporal onde o(s) artrópode(s) se encontrava(m) fixado(s), sendo esta assinalada num esquema incluído no inquérito.

Esse mesmo esquema foi reconstituído (Fig. 5) de forma a apresentar, em simultâneo, todas as localizações onde foram encontrados artrópodes podendo, assim, definir quais as zonas prediletas à fixação destes. Os artrópodes foram encontrados, sobretudo, nas orelhas e face palmar dos membros anteriores (espaços interdigitais). Não foram identificadas as espécies de artrópodes recolhidas, uma vez que apenas 4,9% dos animais amostrados apresentavam artrópodes fixados. No entanto, sabe-se que as espécies de artrópodes identificadas na região em estudo são, sobretudo, *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor*

marginatus, *Hyalomma lusitanicum* e *Hyalomma marginatum* (Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infecciosas Doutor Francisco Cambournac 2019).

LOCALIZAÇÃO DAS CARRAÇAS

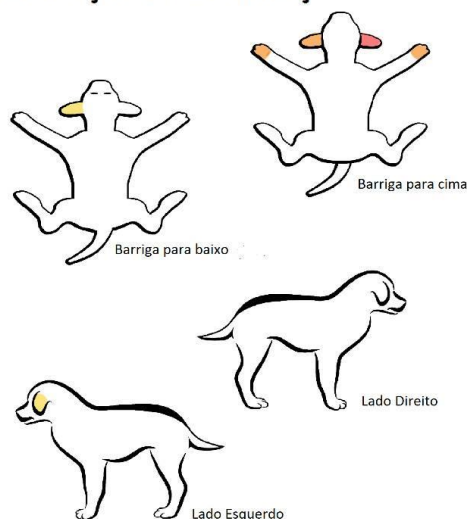


Figura 5 - Localização dos artrópodes encontrados no exame físico de cinco animais incluídos no estudo. 3 destes animais apresentavam artrópodes fixados na face interna da orelha esquerda. 2 animais apresentavam artrópodes na face palmar dos membros anteriores e na face interna da orelha direita. 1 destes animais apresentava artrópodes na face externa da orelha direita. (Adaptado de: <https://www.puppyup.org/its-what-if-dogs-and-cats-had-opposable-thumbs-day/>)

4.3.3. Análise espacial

4.3.3.1. *A. phagocytophilum*

No estudo da distribuição geográfica de *A. phagocytophilum* (Fig.6) é apenas possível analisar a distribuição dos animais considerados duvidosos na análise sorológica realizada, uma vez que nenhum animal se revelou positivo na pesquisa de anticorpos contra este agente, não podendo determinar um padrão de distribuição dos casos positivos.

Assim sendo, atentando os três animais duvidosos, verifica-se que um (33,3%) destes habita em área urbana na freguesia de Azaruja, concelho de Évora (n=1). Os outros dois (66,7%) animais habitam em zonas consideradas peri-urbanas, uma vez que habitam no limite das cidades de Borba, concelho de Borba (n=1) e Elvas, concelho de Elvas (n=1), sendo as suas habitações cercadas por terrenos com características de ambiente rural, aos quais estes animais têm frequentemente acesso.

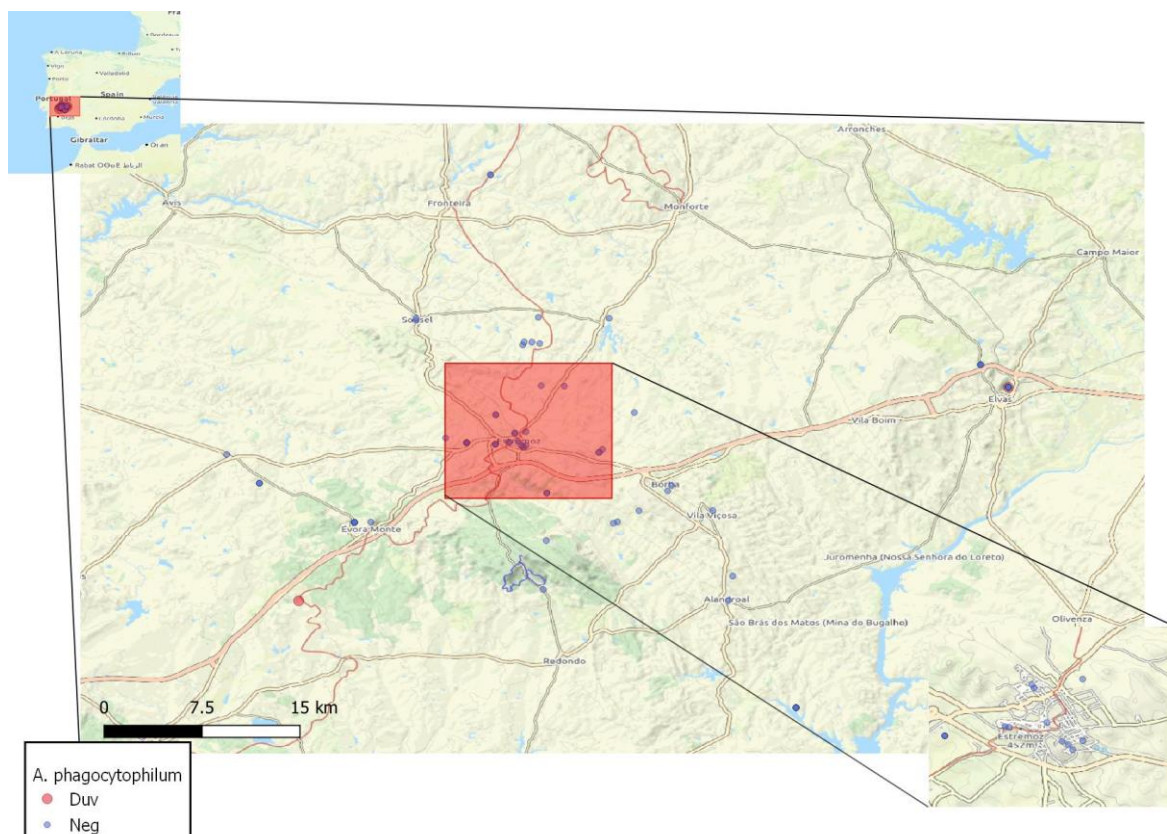


Figura 6 – Distribuição geográfica dos cães considerados duvidosos (vermelho) e negativos (azul) na análise sorológica de *A. phagocytophilum*. (Original)

4.3.3.2. *E. canis*

No estudo da distribuição geográfica dos casos positivos a *E. canis* (Fig. 7), constata-se que, embora possam ser identificados casos positivos em toda a área amostrada, a maioria destes ocorre em zonas peri-urbanas e rurais, estando os animais frequentemente em contexto rural. Cinco (20,8%) destes ocorrem em áreas urbanas – um animal residente na freguesia de Arcos e dois animais residentes na cidade de Estremoz, os três pertencentes ao concelho de Estremoz (n=3), um animal na vila de Azaruja, concelho de Évora (n=1) e um animal na cidade de Sousel, concelho de Sousel (n=1). Em contexto rural, ocorrem oito casos de *E. canis* (33,3%). Estes animais habitam vários montes que pertencem a diferentes concelhos – Estremoz (n=6), Sousel (n=1) e Vila Viçosa (n=1). Os restantes onze casos positivos de *E. canis* (45,8%) ocorrem nas regiões limítrofes das áreas urbanas (áreas peri-urbanas) – regiões que embora estejam inseridas na urbanização, têm na sua envolvência um contexto rural, estando os animais facilmente expostos a este tipo de ambiente – nove habitam no limite da cidade de Borba, concelho de Borba (n=9) e dois no limite da cidade de Elvas, concelho de Elvas (n=2).

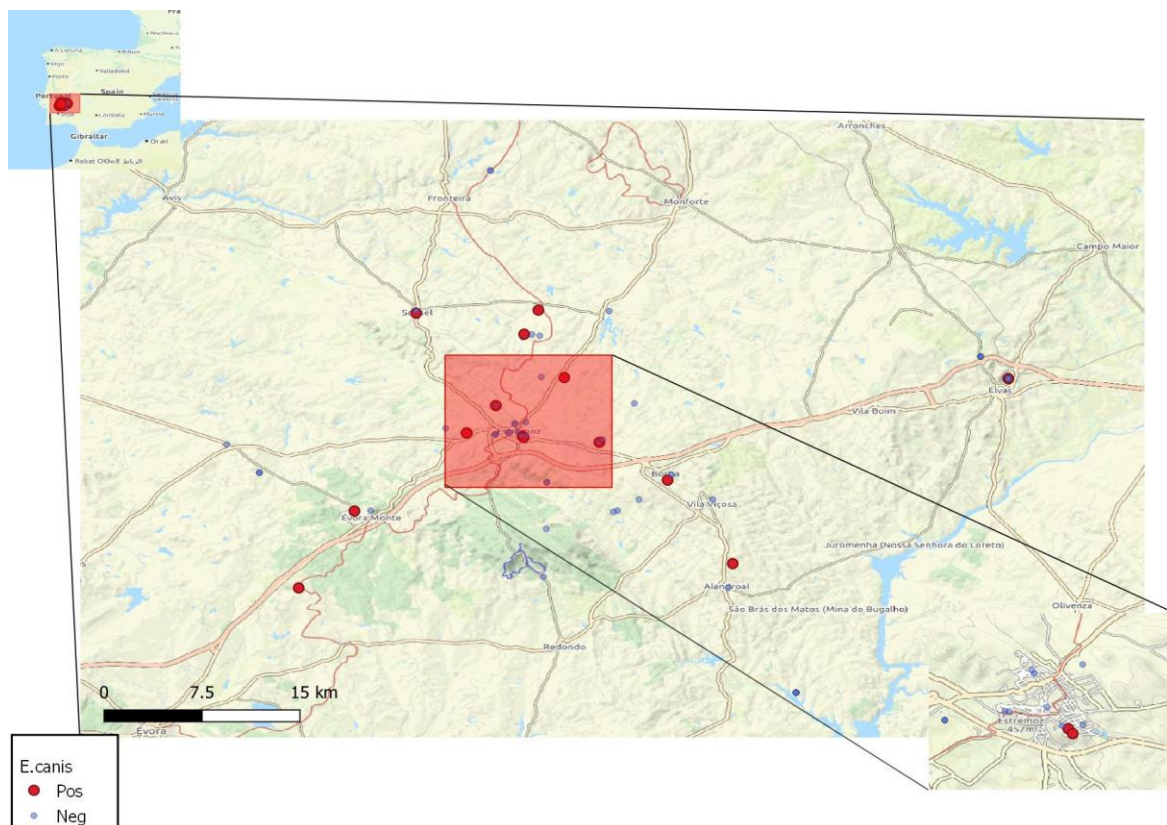


Figura 7 - Distribuição geográfica dos cães considerados positivos (vermelho) e negativos (azul) na análise sorológica de *E. canis*. (Original)

4.3.3.3. *B. canis*

No estudo da distribuição dos animais positivos na titulação de anticorpos de *B. canis* (Fig. 8) é possível identificar um aparente padrão. Embora possam ser identificados casos positivos em toda a área amostrada, também a maioria destes ocorre em zonas peri-urbanas e rurais, estando os animais frequentemente em contexto rural.

Dez dos casos positivos (37%) ocorrem em meio rural, em montes pertencentes aos concelhos de Alandroal (n=3), Estremoz (n=6) e Sousel (n=1). Onze dos animais positivos (40,7%) ocorrem em áreas peri-urbanas – seis animais residentes nas regiões limítrofes da cidade de Borba, concelho de Borba (n=6) e cinco animais residentes nas regiões limítrofes da cidade de Elvas, concelho de Elvas (n=5). Estes animais, embora residam numa morada considerada urbana, têm facilmente acesso à região envolvente, que apresenta características rurais. Apenas seis dos animais positivos (22,2%) na sorologia para *B. canis* habitam em zonas urbanas – um animal na freguesia de Arcos e quatro animais na cidade de Estremoz, todos pertencentes ao concelho de Estremoz (n=5) e um animal na cidade de Sousel, concelho de Sousel (n=1).

Existe, no entanto, um facto que condiciona a interpretação desta distribuição geográfica: 2 (7,4%) dos casos positivos estão vacinados contra *B. canis*. Assim sendo e, pela limitação da análise sorológica que não distingue anticorpos vacinais de anticorpos produzidos pelo indivíduo após infeção, não é possível garantir que esta distribuição corresponda, verdadeiramente, ao padrão de animais que contactou de forma natural com o agente.

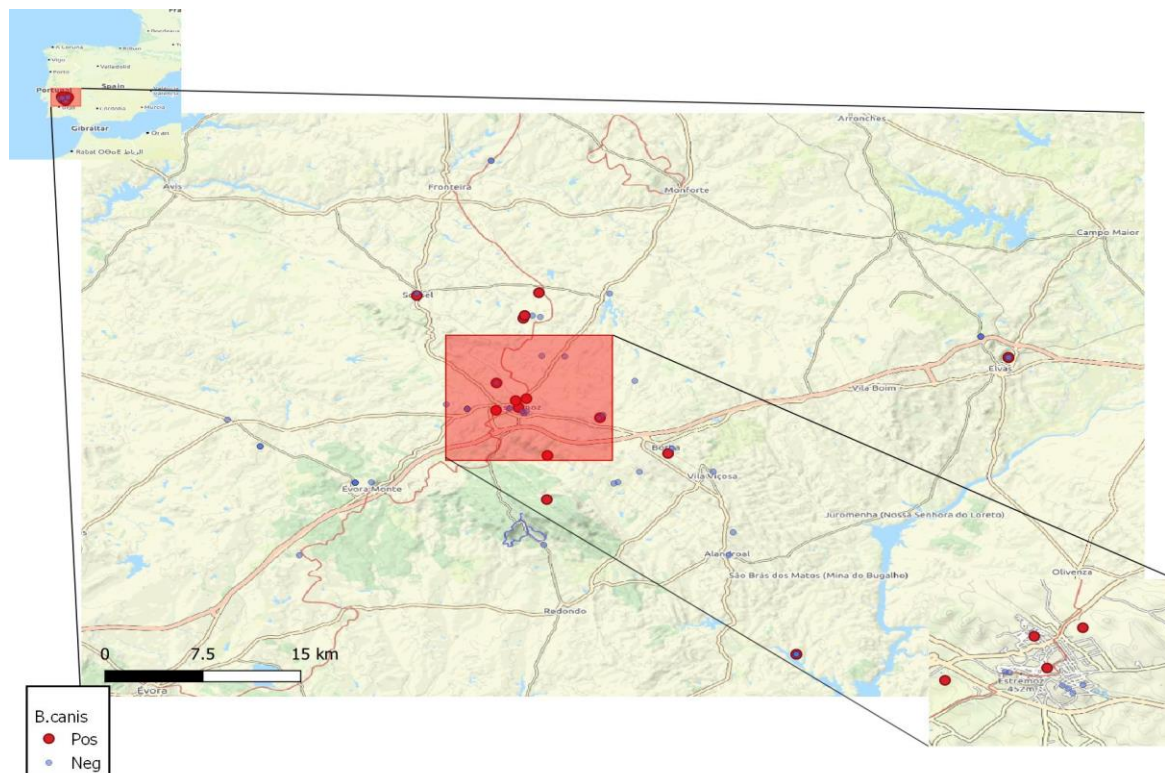


Figura 8 – Distribuição geográfica dos cães considerados positivos (vermelho) e negativos (azul) na análise sorológica de *B. canis*. (Original)

4.3.3.4. *L. infantum*

Na observação da distribuição dos casos positivos a *L. Infantum* (Fig. 9) foi, igualmente, possível observar uma aparente tendência. A grande maioria dos animais diagnosticados com este agente – vinte e dois animais (62,9%) – habita em contexto rural, nos vários montes pertencentes aos diferentes concelhos – Alandroal (n=7), Elvas (n=2), Fronteira (n=1), Estremoz (n=10), Sousel (n=1) e Vila Viçosa (n=1). Oito dos animais positivos (22,9%) na pesquisa de anticorpos contra *L. Infantum* habitam em áreas peri-urbanas, no limite das cidades de Borba, concelho de Borba (n=6) e Elvas, concelho de Elvas (n=2).

Apenas cinco (14,3%) dos casos positivos ocorrem em ambiente urbano – um animal na freguesia de Arcos, dois animais na cidade de Estremoz, um animal na freguesia de São

Lourenço de Mamporcão, todos residentes no concelho de Estremoz (n=4) e um animal residente na freguesia de Rio Moínhos, concelho de Borba (n=1).

Importa ressaltar que a análise sorológica não distingue anticorpos vacinais de anticorpos naturais produzidos após infecção pelo agente. Assim e, pelo facto de 10 (28,6%) dos animais positivos à presença de anticorpos anti-*L. infantum*, serem, de facto, vacinados contra a doença, não pode ser garantida que a distribuição dos casos positivos aqui analisada corresponda verdadeiramente ao padrão de distribuição de animais que contactaram com o agente de forma natural.

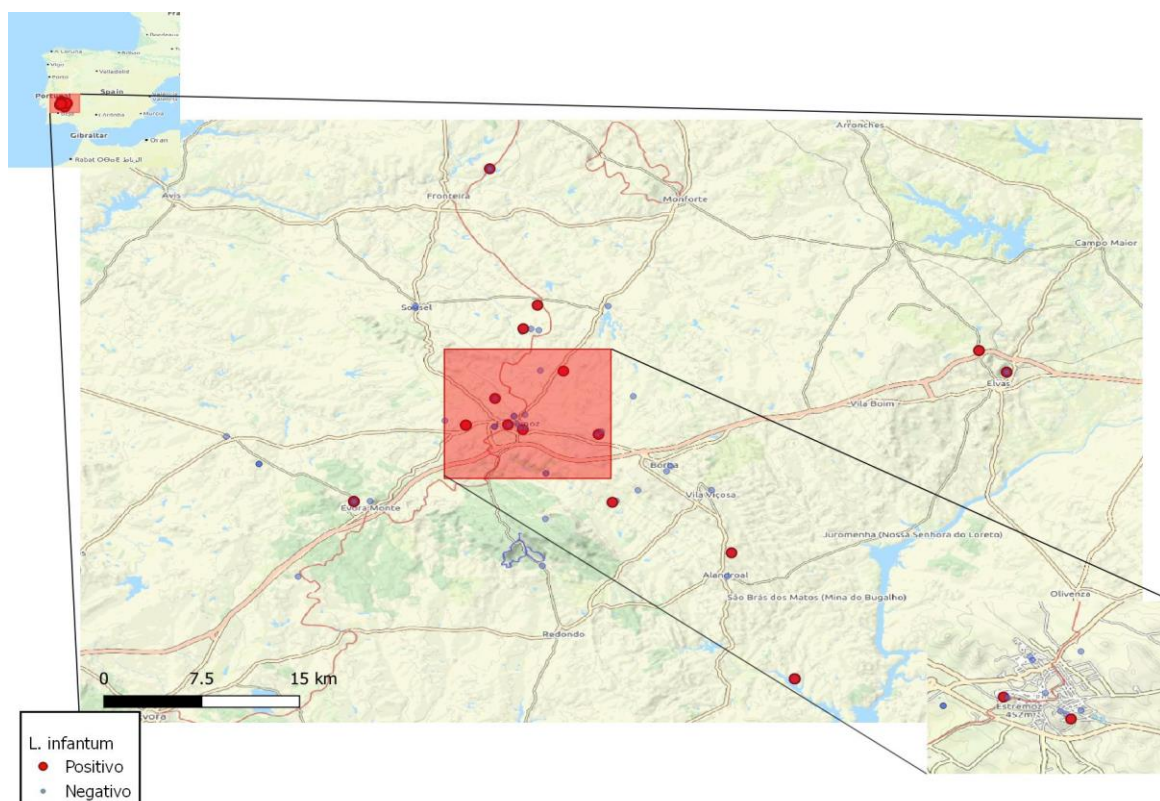


Figura 9 - Distribuição geográfica dos cães considerados positivos (vermelho) e negativos (azul) na análise sorológica de *L.infantum*. (Original)

4.3.3.5. *D. immitis*

Considerando, por fim, a análise sorológica realizada para *D. immitis*, constata-se que apenas um animal é positivo à presença de antigénio contra este agente. Naturalmente, não é possível compreender um padrão de distribuição geográfica deste agente. No entanto, para efeitos descritivos, o único animal positivo habita em meio rural, num monte pertencente à freguesia de Rio de Moinhos, concelho de Borba (n=1) (Fig. 10).

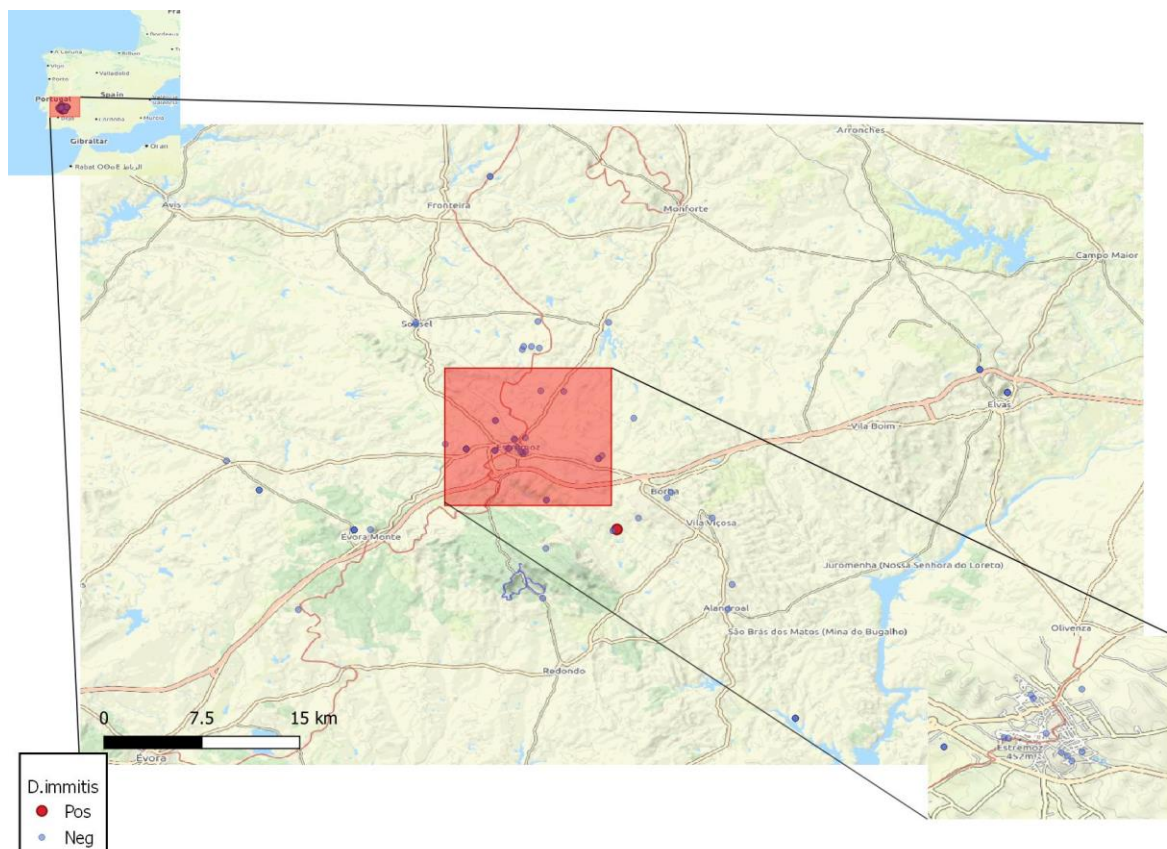


Figura 10 - Distribuição geográfica dos cães considerados positivos (vermelho) e negativos (azul) na análise sorológica de *D. immitis*. (Original)

4.3.4. Fatores de risco

4.3.4.1. *A. phagocytophilum*

A distribuição dos hipotéticos fatores de risco inquiridos e a relação destes com os resultados da seroprevalência de *A. phagocytophilum* após elaboração da análise univariada encontra-se em descrita numa tabela em anexo (anexo 4).

Considerando que nenhum dos animais incluídos no presente estudo foi efetivamente positivo à presença deste agente não foi possível obter associação estatística significativa entre a seroprevalência do agente e qualquer um dos possíveis fatores de risco em análise. Por esta razão, não foi elaborado um modelo de regressão logística para *A. phagocytophilum*.

4.3.4.2. *E. canis*

Os resultados da relação estatística univariada estabelecida entre cada um dos hipotéticos fatores de risco inquiridos e a seroprevalência de *E.canis* encontram-se descritos em tabela (anexo 5).

Na primeira fase do modelo, sete variáveis foram identificadas com $p < 0,2$. No entanto, apenas seis variáveis foram selecionadas para integrar o modelo de regressão logística, a saber: “idade”, “raça”, “aptidão”, “acesso ao exterior”, “contacto com animais com diagnóstico de hemoparasitas” e “historial de doença dermatológica”. A variável “utilização de Seresto®”, apesar de $p = 0,02$, foi excluída – serão apenas considerados como fatores de risco, em termos de profilaxia, se existe proteção contra artrópodes e/ou contra flebótomos e mosquitos e, se esta é realizada de forma regular ou irregular. Não serão considerados e analisados, de forma individual, os produtos utilizados para o efeito, de modo a facilitar a análise estatística.

Os resultados da regressão logística multivariada realizada para *E.canis* estão expressos na tabela 4. Segundo estes, existem dois grupos de animais em maior risco de infeção por este agente: animais séniores e animais de raça indefinida.

Tabela 4 - Resultados do modelo de regressão logística de *E.canis* (as variáveis significativas encontram-se a negrito)

Variável	Fatores	Odds Ratio	95% C.I.		p
Idade	Adulto	Parâmetro de referência	-----	-----	0,0004
	Jovem	0.00	NA	3.75×10^{51}	
	Sénior	5.61	1.54	22.31	
Raça	Definida	Parâmetro de referência	-----	-----	0,0001
	Indefinida	4.89	1.72	14.68	

4.3.4.3. *B.canis*

Considerando *B. canis*, encontram-se descritos em tabela (anexo 6) os resultados da relação estatística realizada numa primeira instância entre todos os possíveis fatores de risco incluídos no inquérito e a seroprevalência deste agente.

À semelhança do que foi descrito anteriormente, também para este agente foram selecionadas as variáveis com $p < 0,2$, tendo estas sido incluídas no modelo de regressão logística que permite uma análise multivariada. As variáveis selecionadas foram, portanto: “idade”, “raça”, “contacto com gatos”, “contacto com caprinos” e “vacinação contra a babesiose canina”.

Os resultados da análise de regressão logística realizada estão explícitos na tabela 5 e, de acordo com estes, pode concluir-se que o grupo de animais séniores é o grupo que apresenta um maior risco de contrair infeção por *B. canis*.

Tabela 5 - Resultados do modelo de regressão logística de *B.canis* (as variáveis significativas encontram-se a negrito)

Variável	Fatores	Odds Ratio	95% I.C.		p
Idade	Adulto	Parâmetro de referência	-----	-----	0,03
	Jovem	0.90	0.13	4.00	
	Sênior	4.78	1.47	16.41	

4.3.4.4. *L. infantum*

Em anexo (anexo 7) encontram-se descritos os resultados da relação estatística univariada estabelecida entre os possíveis fatores de risco inquiridos e a seroprevalência de *L. infantum* no presente estudo.

Após esta primeira fase da análise, foram selecionadas catorze variáveis cujo $p < 0,2$. No entanto, apenas oito destas foram incluídas na análise de regressão logística.

À semelhança do já descrito anteriormente, as variáveis “Vectra®”, “Seresto®” e “Advantix®” foram excluídas de modo a facilitar a análise estatística. Também a variável “Vacinado com Canileish®” foi excluída, de modo a facilitar a análise estatística; será considerado, apenas, se os animais estão ou não vacinados contra a leishmaniose canina. As variáveis “contacto com animais com diagnóstico de hemoparasitas” e “presença de artrópodes” foram excluídas por razões de natureza biológica. Não faz sentido considerar esta associação estatística quando se encontram em análise os possíveis fatores de risco associados à prevalência de *L. infantum*, agente transmitido por um flebótomo.

Assim sendo, foram integradas no modelo de regressão logística as seguintes variáveis: “idade”, “aptidão”, “acesso ao exterior”, “exposição a ambiente rural”, “contacto com caça”, “proteção contra artrópodes”, “proteção contra mosquitos/flebótomos”, “vacinação contra leishmaniose canina”. O fator “proteção contra artrópodes” foi mantido, uma vez que alguns dos princípios ativos utilizados no combate a artrópodes têm, igualmente, ação contra o flebótomo. Simultaneamente, pretende-se estudar a possibilidade de alguma indicação *off-label* destes mesmos produtos, isto é, a possibilidade de existir uma ação contra o flebótomo, embora esteja apenas descrita a sua ação contra artrópodes.

Os resultados desta análise encontram-se descritos na tabela 6 e, de acordo com os mesmos, identificam-se três grupos de maior risco na probabilidade de contrair infeção por *L. Infantum*: animais de criação, animais com acesso permanente ao exterior e animais que mantêm uma rotina profilática contra mosquitos.

Tabela 6 - Resultados do modelo de regressão logística de *L. infantum* (as variáveis significativas encontram-se a negrito)

Variável	Fatores	Odds Ratio	95% C.I.		p
Aptidão	Companhia	Parâmetro de referência	-----	-----	0,04
	Caça	1.86	0.29	15.88	
	Criação	8.02	2.04	37.64	
	Guarda	0.23	0.05	0.94	
Acesso ao exterior	Intermitente	Parâmetro de referência	-----	-----	0,06
	Permanente	10.50	2.69	50.63	
Proteção contra mosquitos/flebótomos	Não	Parâmetro de referência	-----	-----	0,02
	Sim	5.07	1.76	16.30	

4.3.4.5. *D. immitis*

Em anexo (anexo 8) encontra-se uma tabela construída com base na relação estatística estabelecida entre os resultados da pesquisa de antígenos de *D. immitis* no soro dos cães incluídos na amostra e os hipotéticos fatores de risco em estudo.

Apesar de algumas variáveis terem, efetivamente, $p < 0,2$, não foi considerada uma análise de regressão logística para este agente por não se considerar estatisticamente significativo qualquer resultado que possa ser obtido, uma vez que existe apenas um animal positivo a *D. immitis* na sorologia.

Em suma, na tabela 7, encontram-se sumarizados todos os fatores de risco associados à seroprevalência de *E. canis*, *B. canis* e *L. infantum*, concluídos a partir das diferentes análises de regressão logística realizadas para estes agentes.

Tabela 7 - Fatores de risco associados à seroprevalência de *E. canis*, *B. canis* e *L. infantum*

Agente	Variável	Fatores	Odds Ratio	95% I.C.	
<i>E. canis</i>	Idade	Sênior	5.61	1.54	22.31
	Raça	Indefinida	4.89	1.72	14.68
<i>B. canis</i>	Idade	Sênior	4.78	1.47	16.41
<i>L. infantum</i>	Aptidão	Criação	8.02	2.04	37.64
	Acesso ao exterior	Permanente	10.50	2.69	50.63
	Proteção contra mosquitos	Sim	5.07	1.76	16.30

4.3.5. Concordância testes rápidos VS análise laboratorial

Como já referido anteriormente, embora não constituísse um objetivo inicial do estudo, casualmente, por razões de ordem profilática e/ou clínica, alguns animais foram testados para a presença de antígenos e/ou anticorpos contra os agentes em estudo através de testes rápidos (imunocromatografia) realizados na clínica. Estes resultados foram registados e comparados, posteriormente, quando obtidos os resultados da análise sorológica realizada em laboratório.

Na totalidade foram realizados 16 testes rápidos que testavam simultaneamente a presença de anticorpos contra *A. platys*, *E. canis* e *L. infantum*. 10 desses testes incluíam, também, a pesquisa do antígeno de *D. immitis*.

Na tabela 8 estão sumarizados os resultados dos diferentes testes realizados para cada agente. Estão descritos o número de casos positivos e o número de casos testados.

Nas tabelas 9 e 10 encontram-se os resultados das análises de concordância entre os resultados obtidos nos testes rápidos realizados em ambiente de clínica e as análises de sorologia executadas em laboratório para pesquisa de anticorpos de *E. canis* e *L. Infantum*, respetivamente. Não foi comparada a concordância dos resultados obtidos no teste rápido e na análise em laboratório para *Anaplasma* spp., uma vez que os kits de diagnóstico rápido utilizados na clínica testavam a presença de anticorpos contra *A. platys* e em laboratório foi testada a presença de anticorpos contra *A. phagocytophilum*. Também não foi comparada a concordância entre os resultados obtidos no teste rápido e os resultados obtidos no laboratório para *D. immitis* uma vez que nenhum animal foi positivo a este agente no teste rápido e, o único animal positivo na sorologia para *D.immitis*, não foi simultaneamente testado por imunocromatografia (teste rápido).

O teste empregue na análise de concordância entre os dois métodos foi o Coeficiente de Concordância de Kappa.

Tabela 8 - Resultados dos diferentes testes de diagnóstico realizados para cada agente

Agente	ELISA	IFI	Imunocromatografia (teste rápido)
<i>A. phagocytophilum</i>	0/102 = 0%	-----	-----
<i>E. canis</i>	24/102 = 22,9%		1/16 = 6,3%
<i>B. canis</i>	-----	27/102 = 26,5%	-----
<i>L.infantum</i>	35/102 = 34,3%	-----	4/16 = 25%
<i>D. immitis</i>	1/102 = 0,98%	-----	0/16 = 0%

Tabela 9 - Resultados da análise de concordância entre ELISA (laboratório) e a técnica de imunocromatografia (teste rápido) de *E.canis*

<i>E. canis</i>	Imunocromatografia (teste rápido)		Kappa de Cohen
ELISA	Positivo	Negativo	-0.103 (-1.040; 0.833)
Positivo	0	3	
Negativo	1	12	

Tabela 10 - Resultados da análise de concordância entre ELISA (laboratório) e a técnica de imunocromatografia (teste rápido) de *L. infantum*

<i>L. Infantum</i>	Imunocromatografia (teste rápido)		Kappa de Cohen
ELISA	Positivo	Negativo	-0.333 (-0.987; 0.320)
Positivo	0	4	
Negativo	4	8	

Analisando os valores de Kappa obtidos nas análises de concordância realizadas entre os resultados obtidos nos testes rápidos (imunocromatografia) e o método laboratorial (ELISA), conclui-se que ambos os valores obtidos (<0) revelam a inexistência de concordância (Landis and Koch 1977) entre os dois métodos de análise sorológica.

5. Discussão

O rastreio realizado como base da presente dissertação de mestrado veio confirmar que a região em estudo é, de facto, uma área considerada de risco para a presença de hemoparasitas, particularmente *E. canis*, *B. canis* e *L. infantum*.

A seroprevalência de *A. phagocytophilum* no presente rastreio foi de 0%. Nenhum dos animais incluídos na amostra foi positivo na pesquisa de anticorpos contra este agente, existindo, no entanto, 3 (2,9%) animais classificados como duvidosos em relação à presença destes anticorpos. Estes dados não se revelam surpreendentes, já que apesar do seu principal vetor – *I. ricinus* – se distribuir por toda a Europa (Stuen et al. 2013; Jahfari et al. 2014; Sainz et al. 2015; Geurden et al. 2018) e, apesar de ser considerado um agente de distribuição global, *A. phagocytophilum* é encontrado, sobretudo, nos países do norte e centro do continente europeu (Sainz et al. 2015). Além disto, os principais hospedeiros reservatório desta espécie são os roedores, ruminantes e fauna silvestre (M.A. Taylor 2016). Embora os nossos resultados revelem valores de seroprevalência inferiores, não estão muito afastados

dos 3,5% de seroprevalência de *Anaplasma* spp. em animais sem sinais clínicos encontrados por Cardoso et al., na região do Alentejo (Cardoso et al. 2012). No entanto, neste estudo de 2012, o método sorológico de pesquisa de anticorpos contra *Anaplasma* spp. previa já a ocorrência de reações cruzadas entre as duas espécies de *Anaplasma*, pelo que para este valor de seroprevalência contribuirá, certamente, o valor da seroprevalência de *A. platys*, cujo vetor é *R. sanguineus* – a espécie de artrópode que mais parasita o cão, em Portugal continental (Cardoso et al. 2012), que não foi determinada no nosso estudo. No entanto, sabe-se que a principal limitação de qualquer método de análise sorológica são as reações cruzadas entre diferentes agentes e espécies (Little 2010; Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016), pelo que não é possível garantir que o mesmo não tenha ocorrido no presente estudo. Importa, igualmente, ressaltar que a pesquisa de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* no presente estudo foi realizada através de ELISA, sendo que o método considerado *gold standard* para a deteção deste agente é a imunofluorescência indireta (Santos et al. 2009; Little 2010; Sainz et al. 2015).

A seroprevalência de *E. canis* neste rastreio foi de 22,9%, I.C.95% [15,2%;32,6%]. Este valor é considerado discrepante quando comparado com os 4,1% de animais positivos sem sinais clínicos no estudo de Cardoso et al. a nível nacional ou os 2,4% registados na região do Alentejo, considerando, igualmente, animais sem manifestações clínicas (Cardoso et al. 2012). É um valor bastante mais concordante se comparado com os 25,4% obtidos também por Cardoso et. al, na região do Alentejo, em animais que apresentavam manifestações clínicas suspeitas de doença transmitida por artrópodes (Cardoso et al. 2012). No entanto, nenhum dos animais incluídos no presente estudo mostrava sinais clínicos de doença. Não é surpreendente, contudo, uma seroprevalência significativa tendo em conta que *R. sanguineus* – principal vetor de *E. canis* – e a própria bactéria são endémicos nos países da bacia mediterrânica, como Portugal (Little 2010; Cardoso et al. 2012; Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016; Geurden et al. 2018; Sanches et al. 2018). No entanto, tal como para *A. phagocytophilum*, a pesquisa de anticorpos anti-*E. canis* foi realizada através de ELISA, que embora seja uma técnica bastante utilizada, não é o método de eleição, ao contrário da imunofluorescência indireta (Cohn 2003; M.A. Taylor 2016). Além disto, e por estar descrita a ocorrência de reações cruzadas entre as várias estirpes de *Ehrlichia* spp. e/ou entre *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. ressalva-se, igualmente, uma possível margem de erro; de facto, os três animais considerados duvidosos na pesquisa de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* foram considerados positivos na pesquisa de *E. canis*, pelo que pode ter existido, realmente, algum grau de reação cruzada na análise destes agentes.

No presente rastreio, a seroprevalência de *B. canis* foi de 26,5%, I.C.95% [18,9%;35,8%]. O método de diagnóstico utilizado prevê a ocorrência de reações cruzadas entre as várias subespécies de *B. canis*, pelo que consideramos esta seroprevalência, de

forma geral, a seroprevalência de *B. canis*. Não existem dados prévios sobre a seroprevalência deste agente na região do Alentejo mas, sendo que se julga que uma das subespécies – *B. canis canis* – ocorra sobretudo na região do norte do país, já que o principal vetor – *D. reticulatus* – é abundante nessa região (Maia, Almeida, et al. 2015) pelo clima frio e húmido característico (Solano-Gallego et al. 2016), 26,5% pode ser considerada uma seroprevalência bastante significativa. Provavelmente, para este valor contribuirá, bastante, a seroprevalência de *B. canis vogeli*, já que o seu principal vetor – *R. sanguineus* –, tal como já referido, é endémico e bastante prevalente em Portugal. Considerando, também, os dados de outro estudo realizado entre 2007 e 2008, que tinha como amostra canídeos autóctones do sul do país e onde foi registada uma seroprevalência de *B. canis* de 58% (Menn et al. 2010; Maia, Almeida, et al. 2015), pode afirmar-se que o nosso estudo vem reiterar que, de facto, a existência deste agente na região sul do país não deve ser negligenciada. Simultaneamente, o valor de seroprevalência registado no presente estudo pode reforçar, também, a hipótese da atual expansão de *D. reticulatus* no espaço europeu (Fourie et al. 2019). De facto, *B. canis canis* é a principal sub-espécie de *Babesia* spp. envolvida nos casos diagnosticados em cães de todo o território europeu (Matijatko et al. 2012; Solano-Gallego et al. 2016; Checa et al. 2019), sendo que a doença causada por este agente tem o estatuto atual de doença emergente (Matijatko et al. 2012; René et al. 2012). Analisando todos estes dados, não podem ser considerados surpreendentes os resultados obtidos na sorologia deste agente na região em estudo. Os valores de seroprevalência registados para *B. canis* foram obtidos através de Imunofluorescência Indireta, o método considerado *gold standard* (M.A. Taylor 2016) se efetuado por um operador experiente, que foi o caso. No entanto, pelo facto da sorologia não permitir a distinção entre anticorpos vacinais e anticorpos naturalmente produzidos pelo indivíduo após contacto com o agente (Maia and Campino 2018; Dantas-Torres et al. 2019) e, considerando que 2 (7,4%) dos casos positivos são animais vacinados, não pode ser garantido que este valor de seroprevalência corresponda, no seu todo, a animais que produziram anticorpos após contacto natural com o parasita.

A seroprevalência de *L. infantum* no presente rastreio foi de 33,7%, I.C.95% [24,8%; 43,7%]. Comparando este resultado com estudos previamente realizados no nosso país, verifica-se que os 33,7% excedem significativamente os 6,3% de média de seroprevalência nacional reportados por Maia et.al (Maia, Almeida, et al. 2015). Excedem, também, os 4,3% em animais aparentemente sem manifestações clínicas ou os 25,2% em animais com sinais clínicos sugestivos de doença, reportados por Cardoso et. al, em panorama nacional. Ainda neste último estudo, o autor refere que existe uma maior seroprevalência da doença na zona sul do país, onde se inclui a região do Alentejo. Nesta região, a seroprevalência reportada foi de 5,9% em animais sem sinais clínicos e de 27,2% em animais com sinais clínicos da doença, num estudo realizado em 2012 (Cardoso et al. 2012). Os resultados de seroprevalência

obtidos revelam um valor bastante expressivo, provavelmente explicado pela atual e global emergência deste agente (Ribeiro et al. 2018; Travi et al. 2018), além da sua endemicidade na área mediterrânica (Maia and Campino 2018; Dantas-Torres et al. 2019), incluindo o nosso país (Maia, Almeida, et al. 2015). Para tal facto contribui também, certamente, a distribuição de flebótomos em diversos microhabitats ao longo da área mediterrânica (Mihalca et al. 2019). Os 33,7% de positividade em animais aparentemente saudáveis, em 2019, atestam, realmente, que *L. infantum* é um agente zoonótico emergente, endémico na região norte interior do Alentejo, talvez também favorecido pela presença de várias explorações vinícolas na área de estudo. As vinhas são áreas de plantação naturalmente ricas em matéria orgânica, condição essencial para a postura de ovos e passagem do estadio larvar ao estadio adulto (Gálvez et al. 2018; Mihalca et al. 2019). Além disto, são áreas frequentemente regadas, permitindo um elevado e constante teor de humidade, abrigadas de vento e com a existência de sombras – condições bastante favoráveis ao estabelecimento de uma população de flebótomos. A pesquisa de anticorpos contra *L. infantum* foi realizada através de ELISA, o método que apresenta maior sensibilidade em animais aparentemente sem manifestações clínicas (Travi et al. 2018) já que a grande maioria dos animais incluídos na amostra não apresentava sinais clínicos suspeitos de doença por *L. infantum*. Não se garante que a totalidade de animais não apresentasse sinais clínicos no momento de inclusão do estudo uma vez que, aquando do decorrer do estudo, *L. infantum* não estava incluído na lista de agentes a rastrear, pelo que as manifestações clínicas mais características do agente não eram registadas. Importa ressaltar a existência de uma margem de erro no valor de seroprevalência de *L. infantum* apresentado, uma vez que a técnica utilizada, tal como todas as técnicas de sorologia, não distingue anticorpos vacinais de anticorpos naturais contra o agente infeccioso (Maia and Campino 2018; Dantas-Torres et al. 2019) e 10 dos casos positivos (28,6%) estão vacinados contra a leishmaniose canina.

Na deteção de antígenos de *D. immitis* neste rastreio e, embora seja uma parasita de distribuição global (McCall et al. 2004; A.H.Society 2018), prevalente nos países do sul da Europa, como Portugal (Genchi and Kramer 2017), foi relatada uma seroprevalência de apenas 0,98%, I.C.95% [0,05%;5,4%]. Este valor está abaixo do intervalo de prevalências nacional – 3,6% a 8,9% –, detetado por Maia et. al em 2015 (Maia, Almeida, et al. 2015) e também abaixo dos 16,5% de seroprevalência média na região do Alentejo registada em 1996 (Araújo 1996). Se comparados com valores obtidos igualmente na região do Alentejo, mas em estudos mais recentes, continua a ser uma seroprevalência inferior aos 4,7% em animais sem manifestações clínicas registados por Cardoso et. al, em 2012 (Cardoso et al. 2012). Sendo a região do Alentejo central uma região de clima temperado, com temperaturas que, tendencialmente, favorecem o desenvolvimento e manutenção de uma população ativa de insetos vetores, além da maturação de microfilárias ingeridas no interior dos mosquitos

(McCall et al. 2004; A.H.Society 2018), este valor reduzido não deixa de ser surpreendente. Além disto, na região em estudo existem diversas explorações pedreiras, zonas com águas paradas, propícias ao desenvolvimento e estabelecimento de populações de mosquito-vetor. No entanto, o número existente de pedreiras pode não ser, de facto, expressivo numa área tão vasta, até porque muitos dos animais incluídos na amostra não habitam em zonas próximas destas explorações. Simultaneamente, a autora deste trabalho desconhece se a utilização de produtos inseticidas e repelentes nestas explorações é praticada como forma a evitar a presença de mosquitos que, com certeza, prejudicam os trabalhos e põem em risco os operadores. A baixa seroprevalência pode, também, estar relacionada com o período temporal no qual decorreu o estudo, uma vez que o período de transmissão do agente na região do distrito de Portalegre, por exemplo, ocorre, sobretudo, entre 31 de Maio a 20 de Outubro (Genchi et al. 2005), sendo o pico de transmissão da doença, no hemisfério norte, nos meses de Julho e Agosto (McCall et al. 2004; A.H.Society 2018). Considerando que a deteção de antígenos nesta espécie ocorre apenas e, pelo menos, 5 meses pós-infecção podendo estar suprimida até 9 meses pós-infecção em animais que realizem profilaxia com lactonas macrocíclicas (A.H.Society 2018) ou que feito tomas continuadas de doxiciclina (Little et al. 2018), entende-se que no período em que decorreu o rastreio – Setembro a Janeiro – não era possível detetar grande parte de possíveis infeções. Igualmente, dada a reduzida pluviosidade nos últimos 3 anos e, provavelmente sem a presença de atividades hortícolas onde por vezes estão presentes pequenos reservatórios de água que sustentam a presença e viabilidade dos estadios larvares, podem estar reduzidas as condições para a existência de vetores de *D. immitis*. A deteção do antígeno de *D. immitis* no presente estudo foi realizada através de ELISA, com recurso a testes comerciais. Não está, excluída, por isso, a ocorrência de reações cruzadas entre diferentes espécies de *Dirofilaria* spp., *Spirocerca lupi*, *Angiostrongylus vasorum* ou *Onchocerca* spp. (Little et al. 2018).

Como já referido anteriormente, além da pesquisa de anticorpos contra os vários agentes patogénicos em estudo, foram também elaborados e observados esfregaços sanguíneos como parte integrante do protocolo de diagnóstico. Relacionando os resultados obtidos na observação destes com os resultados evidenciados na análise sorológica verifica-se uma clara discrepância. A observação de esfregaços sanguíneos feita a partir de sangue dos capilares da orelha não permitiu identificar qualquer um dos agentes em estudo. Esta observação permitiu apenas a classificação do animal como suspeito ou não suspeito da presença de hemoparasitas. Dos 102 esfregaços, apenas 22 (21,6%) se revelaram suspeitos da presença de hemoparasitas. Comparando estes registos com os resultados da sorologia, depreende-se que há pouca correlação – 10 dos 22 animais com esfregaços suspeitos (45,5%) foram negativos na pesquisa de anticorpos para qualquer um dos agentes em questão. Os restantes 12 animais cujo esfregaço se revelou suspeito revelaram anticorpos

contra *E. canis*, *B. canis*, *L. infantum* e/ou *D. immitis*. No entanto, pelas suas maiores dimensões e forma característica, pode concluir-se que não foi observada *B. canis* em nenhum dos esfregaços analisados, já que a observação desta espécie de parasita ocorre na maior parte das infeções (Solano-Gallego et al. 2016). Também não foi observada *L. infantum* em nenhuma das lâminas, mas, de facto, um esfregaço de células sanguíneas não é, de todo, a amostra ideal para deteção deste agente, já que a observação do protozoário em esfregaços sanguíneos é raramente reportada (Zajac and Conboy 2012). No entanto, tal como já foi previamente mencionado, no desenho inicial do presente estudo *L. infantum* não era incluída na lista de parasitas a rastrear, pelo que não foram realizados esfregaços a partir de PAAF's/biópsias de linfonodos, medula óssea ou por raspagem de lesões cutâneas (Zajac and Conboy 2012; M.A. Taylor 2016; Ribeiro et al. 2018). Não foram, também, detetadas microfilárias de *D. immitis* em nenhum dos esfregaços analisados, embora exista um animal positivo à titulação de anticorpos deste agente. De facto, este animal já havia sido previamente diagnosticado e estava em processo de tratamento quando foi incluído na amostra (ressaltar que no desenho inicial do presente estudo, *D. immitis* não era também incluído na lista de parasitas a rastrear, pelo que este animal, por não apresentar sinais clínicos sugestivos de doenças transmitidas por artrópodes – foco inicial do estudo – não foi automaticamente excluído da amostra). Neste protocolo terapêutico estão incluídos diversos fármacos, incluindo lactonas macrocíclicas que, pelo seu efeito microfilaricida (A.H.Society 2018), podem ter interferido na deteção de microfilárias no esfregaço deste animal. Além disso, este método é considerado pouco sensível quando as microfilárias estão presentes já em reduzida concentração (50-100/mL) (McCall et al. 2004; A.H.Society 2018).

Assim sendo, a observação dos esfregaços sanguíneos realizados como parte integrante do rastreio realizado veio reforçar as guidelines já existentes – a não observação de formas parasitárias num esfregaço não pode excluir um diagnóstico de hemoparasitas, sobretudo se os animais forem subclínicos e/ou crónicos, como foi o caso de todos os animais incluídos na amostra. Nestes casos, raramente existem níveis de parasitémia que permitem a deteção do agente no esfregaço (Borin et al. 2009; Little 2010; Solano-Gallego and Baneth 2011). Além disto, a elaboração e observação de um esfregaço sanguíneo é considerado um método de diagnóstico com baixa sensibilidade (Sainz et al. 2015), sobretudo se realizado por um operador que não tem uma vasta experiência em trabalho laboratorial, como é o caso da autora. Para colmatar esta lacuna, a grande maioria dos esfregaços foi verificada, em simultâneo, pela técnica superior do laboratório de parasitologia Victor Caeiro.

Não obstante, importa mencionar, por outro lado, que os valores obtidos na sorologia não se traduzem, necessariamente, em infeção atual ou doença. A deteção de anticorpos contra determinado agente no soro de um animal apenas indica que este animal teve contacto com o agente, no passado ou presente, tendo desenvolvido uma resposta imunitária (M.A.

Taylor 2016). Isto porque os títulos de anticorpos podem manter-se elevados durante meses ou anos, ainda que se trate de uma possível infecção antiga já resolvida (inclusive após tratamento) ou de uma infecção atual, mas subclínica, não sendo a causa do quadro patológico apresentado na consulta (Cohn 2003; Little 2010; Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016; Duthie et al. 2018; Maia and Campino 2018). Simultaneamente, apesar de apresentarem valores de sensibilidade e especificidade elevados, está reportada a ocorrência de reações cruzadas entre diferentes espécies do mesmo agente e diferentes agentes, além dos falsos positivos – em zonas altamente endêmicas um animal clinicamente saudável pode, efetivamente, ter título de anticorpos detetáveis e nunca vir a desenvolver a doença – e falsos negativos – se a doença está no período de incubação ou no início da fase aguda, sem ter ocorrido, ainda, seroconversão (McCall et al. 2004; Little 2010; Sainz et al. 2015; Solano-Gallego et al. 2016; Maia and Campino 2018; Ribeiro et al. 2018; A.H.Society 2018) ou, no caso de infecção por *D. immitis*, quando a carga parasitária é reduzida ou estão presentes apenas machos adultos/fêmeas imaturas (McCall et al. 2004; A.H.Society 2018).

Comparando, também, os resultados obtidos através dos testes rápidos (imunocromatografia) realizados na clínica e os resultados obtidos através de ELISA em laboratório, verifica-se a ausência total de concordância. Estes resultados acabam por se revelar preocupantes, sobretudo porque decisões clínicas são, frequentemente, tomadas com base nos resultados obtidos através dos testes rápidos realizados na clínica – animais iniciam tratamento da doença mediante um resultado falso positivo, ou iniciam o protocolo vacinal (no caso de *L. Infantum*) mediante um resultado falso negativo. Ficam, no entanto, por esclarecer quais os motivos que estão na base desta falta de concordância, uma vez que os testes comerciais utilizados reportam valores de sensibilidade e especificidade muito elevados (>90%). Uma hipótese recai sobre as diferentes condições em que são realizados os testes, sendo o ambiente de clínica menos controlado, com maior possibilidade de ocorrência de erros no cumprimento do protocolo. A esta hipótese, acresce o facto do teste rápido ser realizado por um operador sem experiência laboratorial. Talvez mais controversa, a sobrevalorização das sensibilidades e especificidades dos testes rápidos, pelos laboratórios que as comercializam, deve ser uma hipótese igualmente levantada, tal como a hipótese de existirem defeitos em alguns lotes de testes. Além disto, os métodos sorológicos realizados em laboratório permitem a titulação de anticorpos e as suas variações em diferentes períodos do curso da doença (Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016), sendo portanto, mais fácil determinar quando existe uma resposta imune ativa. Mais estudos, com maior dimensão de amostra, são necessários para esclarecer e validar estas questões.

Conclui-se, assim, que o método de diagnóstico ideal passa pela realização conjunta de PCR e sorologia, além da observação detalhada do esfregaço. Este método conjunto salvaguarda possíveis reações cruzadas entre os agentes, permite uma maior precisão no

diagnóstico e a detecção de co-infecções (Little 2010; Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016). A análise de PCR demonstra grande sensibilidade na detecção do DNA de cada um destes agentes, mesmo em doentes subclínicos e/ou crónicos (Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016; Solano-Gallego et al. 2016), confirmando que naquele momento o agente está presente na circulação sanguínea do animal testado. Contudo, embora raros, podem igualmente ocorrer falsos negativos, na fase inicial da doença se o agente não se encontrar em concentrações mínimas detetáveis; também a bacterémia pode ser intermitente ou pode ser influenciada caso se proceda à análise depois do tratamento iniciado (Little 2010; Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016). Também estão descritas reações cruzadas entre alguns agentes (Stuen et al. 2013; Sainz et al. 2015), pelo que o ideal será sempre a utilização conjunta de diferentes métodos de diagnóstico, de modo a colmatar o maior número de lacunas possíveis que cada um dos métodos apresenta.

Relativamente à análise de fatores de risco realizada para os três agentes cuja seroprevalência é estatisticamente significativa – *E. canis*, *B. canis* e *L. infantum* –, foram identificados possíveis fatores de risco associados à infeção por cada um destes agentes.

Considerando *E. canis*, existem dois grupos de animais que parecem estar em maior risco de adquirir a infeção: animais séniores e animais de raça indefinida. Analisando o grupo de animais séniores, os dados obtidos estão em concordância com Sainz et. al que também diagnosticou uma maior seropositividade de *E. canis* em cães de maior idade (Sainz et al. 2015). Tal facto parece apenas refletir a probabilidade acumulada de contacto com o vetor e, consequentemente com o agente, ao longo dos anos, não constituindo, efetivamente, um fator de risco. A raça parece ser, também, um fator determinante – animais de raça indefinida parecem ter maior probabilidade de ser infetados. Não estão descritas predisposições rácicas em relação à infeção por *E.canis*, embora esteja descrito que animais de raça Pastor Alemão e Huskie Siberiano possam apresentar uma maior predisposição ao desenvolvimento de doença clínica, com manifestações severas (Little 2010; Sainz et al. 2015; M.A. Taylor 2016). No entanto, esse fator não foi analisado no presente estudo uma vez que nenhum dos animais incluídos na amostra apresentava sinais clínicos sugestivos de doença transmitida por artrópodes. Além disso, não foram analisadas as diferentes raças de animais incluídos na amostra, tendo os animais sido apenas categorizados como raça definida/sem raça definida de modo a facilitar a análise estatística. A autora levanta a hipótese desta associação estatística poder estar relacionada com o facto de, tendencialmente, animais de raça indefinida estarem associados a menores cuidados de profilaxia e a um estilo de vida com maior permanência em ambiente exterior, tendo maior risco de exposição ao artrópode vetor, aumentando a probabilidade de infeção; mais estudos são necessários para esclarecer esta questão.

Analisando os possíveis fatores de risco associados à infecção por *B. canis* foi identificado apenas um grupo de animais em maior risco na aquisição da infecção por este agente – o grupo de animais séniores. Tal como para *E. canis*, não se julga que a idade seja um verdadeiro fator de risco, sendo este facto resultante da probabilidade acumulada de contacto com o vetor e agente patogénico. Embora na literatura esteja descrita uma maior prevalência de doença clínica por *B. canis* nos cães de raça Pastor Alemão e Komondor (Solano-Gallego et al. 2016), no presente estudo não foi possível determinar uma predisposição rácica, também porque as diferentes raças de cães incluídos na amostra foram agrupadas apenas em animais de raça definida, contrastando com o grupo de animais de raça indefinida. Do mesmo modo e, como já anteriormente mencionado, não foi avaliada a severidade de sinais clínicos em animais diagnosticados com o agente na sorologia já que todos os cães incluídos na amostra se apresentavam sem manifestações clínicas.

Por fim, considerando os animais positivos na titulação de anticorpos anti-*L. infantum* e a análise de regressão logística realizada para este agente foram identificados três grupos de animais, teoricamente, em maior risco de contrair a infecção: animais de criação, animais com acesso permanente ao exterior e animais que utilizam repelente de mosquitos. Não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre o comprimento do pêlo e a ocorrência de infecção por *L. infantum*, ao contrário do que está sugerido na literatura (Ribeiro et al. 2018). Em relação ao grupo de animais de criação, não está descrita na literatura qualquer referência a maior risco de exposição ao agente em animais com esta aptidão, apenas em animais de trabalho – guarda e caça – pela sua permanência maioritariamente/permanentemente em ambiente *outdoor* (Ribeiro et al. 2018). Embora pareça ser difícil explicar este maior risco associado aos animais de criação, a autora julga que possa estar associado à maior densidade populacional, menores cuidados de higiene e profilaxia que se praticam, frequentemente, nestes espaços dedicados apenas à reprodução de animais com fins lucrativos. Aliado a estes fatores está também, provavelmente, a junção de diferentes animais com desconhecidas proveniências e condições sanitárias, além de uma maior área de acesso e tempo de exposição a ambiente exterior, com a presença de erva, madeira (ambiente propício ao estabelecimento de populações de artrópodes) e arbustos (propício ao estabelecimento de flebótomos), aumentando o potencial contacto com vetores. Contribuirá também, certamente, a transmissão vertical do agente, além da imunossupressão associada às sucessivas gestações destes animais. Avaliando o grupo de animais com acesso permanente ao exterior era expectável que fosse um grupo considerado de risco na probabilidade de infecção por *L. infantum*. Acabou por ser confirmado com a análise de regressão logística. Este maior risco será plausivamente explicado pela maior e acumulada exposição aos insetos vetores já que as principais espécies de flebótomos na zona mediterrânica são exofílicas e exofágicas (Gálvez et al. 2018). Por fim, relativamente ao maior

risco de infeção pelo grupo de animais que utiliza repelente de mosquitos, talvez seja, à primeira vista, uma informação aparentemente não concordante. Embora este maior risco possa, efetivamente, estar associado a uma má utilização dos produtos com efeito repelente – não cumprimento da regularidade dos prazos de aplicação e não aplicação durante todo o ano, ocorrendo na região temperaturas que permitem a presença de vetores quase durante todo o ano – ou uma reduzida eficácia dos princípios ativos dos produtos eleitos, julga-se que este aparentemente maior risco seja, efetivamente real, e, pelo facto dos tutores terem consciência de que as áreas onde os seus animais habitam são áreas de maior risco, utilizem produtos repelentes de insetos para o minimizar, de algum modo. No entanto, estes dados acabam por reforçar as conclusões de vários estudos que indicam que, apesar de seriamente recomendada, a utilização de repelentes como controlo químico do inseto vetor não demonstra eficácia satisfatória (M.A. Taylor 2016). Simultaneamente, este grupo de maior risco pode, igualmente, refletir uma das limitações de um estudo transversal, como foi o caso – possivelmente, alguns dos animais incluídos no rastreio começaram a utilizar produtos com propriedades de repelente apenas e após terem sido diagnosticados com leishmaniose (recorde-se que, como inicialmente, *L. infantum* não era um agente a incluir, os tutores dos animais não foram inquiridos sobre este possível diagnóstico anterior). Idealmente e, para evitar esta limitação deveria ter sido realizado um estudo de *coorte* em que seriam estudados dois grupos, analisando, posteriormente, quais os fatores de risco no grupo que contraiu a doença. No entanto, pelas limitações económicas e, sobretudo, pela duração limitada do período temporal necessário para a conclusão da dissertação de mestrado, não foi possível realizar o estudo sobre este desenho. Ressalva-se, ainda, que os dados sobre a rotina profilática foram, maioritariamente, obtidos através do inquérito realizados aos tutores dos animais. Em alguns casos, a rotina profilática pôde ser atestada, por consulta do boletim sanitário do animal ou pelo acesso ao histórico clínico do animal no CVEVV, mas, noutros casos em que os animais não eram seguidos clinicamente no CVEVV e/ou os tutores não faziam questão que fosse registada no boletim cada profilaxia realizada (até porque, por vezes, os tutores compram os produtos e aplicam em casa) não foi possível verificar a fidedignidade dos protocolos profiláticos utilizados. De qualquer modo, o uso dos produtos de profilaxia contra artrópodes, mosquitos e flebótomos deve ser mantido durante todo o ano, cumprindo a sua periodicidade. Apesar da temperatura mínima para a atividade do flébotomo ser de 15,6°C (ECDC) e a temperatura mínima para desenvolvimento larvar de *D. immitis* ser de 14°C (Genchi et al. 2005), existindo, teoricamente, um menor risco de transmissão da doença nos meses mais frios, uma profilaxia realizada de modo regular, durante todo o ano, maximiza a eficácia (A.H.Society 2018). Também nas doenças transmitidas por artrópodes, a profilaxia durante todo o ano é adequada, uma vez que é cada vez mais difícil prever o início do ciclo de vida do artrópode pelo facto de, diferentes estadios, de diferentes espécies se

manterem ativos em diferentes alturas do ano, em diversas áreas (Sainz et al. 2015; Dantas-Torres and Otranto 2016). Além das alterações climáticas (Little 2010), o facto de muitos animais viverem atualmente no interior das habitações permite que as temperaturas ambientais em que o animal habita sejam amenas, mesmo no Inverno (Sainz et al. 2015).

Por existir apenas um animal positivo a *D.immitis* não foi considerada uma análise de regressão logística de possíveis fatores de risco, uma vez que nenhuma possível associação resultante desta seria considerada significativa. Também para *A. phagocytophilum* não foi realizada uma análise de regressão logística por não existir nenhum animal positivo na titulação de anticorpos contra este agente.

Relativamente à análise de distribuição geográfica dos casos positivos de cada agente, importa referir que apenas foi possível observar um aparente padrão no mapeamento dos casos positivos de *E. canis*, *B. canis* e *L. infantum*. No caso de *E. canis* e *B. canis*, a grande maioria dos casos positivos na sorologia habita em meio rural e peri-urbano, tendo frequentemente acesso a contexto rural. No caso de *L. infantum*, a grande maioria dos animais positivos na sorologia habita em meio rural. Não foi possível observar nenhum padrão de distribuição dos casos de *A. phagocytophilum*, uma vez que nenhum dos animais foi positivo na análise sorológica; de forma semelhante, no caso da infeção por *D. immitis*, pelo facto de apenas ter sido detetado um animal positivo a este agente não é possível estabelecer um padrão de distribuição dos casos positivos. No entanto, importa salvaguardar que esta análise é apenas observacional, sendo necessários mais estudos, com diferentes ferramentas de localização e análise espacial para, de facto, determinar e, caso exista, definir, um padrão para a ocorrência de cada um destes agentes.

Apesar de ter sido um estudo bastante amplo que permitiu a realização e observação de esfregaços sanguíneos de 102 cães, bem como a titulação de anticorpos de cinco agentes no soro de todos os cães amostrados, além do estudo da distribuição geográfica dos animais positivos a cada agente, análise dos possíveis fatores de risco associados à infeção por estes e, ainda, a testagem de concordância entre diferentes métodos de diagnóstico, este estudo teve, naturalmente, várias limitações. As principais limitações, segundo a autora, são devidas à reduzida verba e ao período temporal limitado inerentes ao facto de se tratar de um estudo experimental no âmbito de uma dissertação de mestrado. Inicialmente, tinha sido considerada a realização de PCR para todos os hemoparasitas em estudo, determinando e comparando a prevalência segundo este teste, com as outras análises realizadas. No entanto, por questões orçamentais e, também, pelo curto período de tempo disponível para a realização do rastreio, esta análise foi excluída.

A dimensão da amostra, idealmente, deveria e poderia ter sido superior, contudo é ainda assim considerada significativa. No dia-a-dia de ambiente hospitalar, com várias consultas, cirurgias e exames complementares a decorrer em simultâneo, nem sempre foi

oportuno a realização do esfregaço sanguíneo e colheita de sangue para sorologia. Paralelamente, alguns tutores não consentiram a inclusão do seu animal como parte da amostra por considerarem os procedimentos necessários demasiado invasivos. O período do ano no qual este estudo decorreu não foi, igualmente, o período considerado ideal. Isto porque, na generalidade, o maior pico de diagnóstico de doenças transmitidas por vetores ocorre nos meses mais quentes do ano pela sazonalidade inerente à conclusão dos diferentes ciclos de vida – vetor e agente patogénico. Do mesmo modo, também nos meses de primavera e verão existe uma maior afluência de animais ao CVEVV, sendo uma época propícia a maior casuística e, conseqüentemente, a uma maior facilidade no aumento da dimensão da amostra. Em relação aos inquéritos, apesar da sua testagem inicial e posteriores correções realizadas em função desta, foi apenas na fase de tratamento das respostas e análise estatística dos dados obtidos que foram concluídas algumas insuficiências e inadequações de algumas perguntas face ao objetivo. Assim, estas questões acabaram por ser adaptadas e transformadas em questões mais generalistas, não incidindo em determinados pormenores que poderiam ter sido determinantes na deteção de outros fatores de risco. Adicionalmente, no desenho inicial do presente estudo, tal como previamente mencionado, *L. Infantum* e *D. immitis* não foram agentes incluídos no grupo de agentes parasitários a ser testados. Como tal, o inquérito não foi formulado de forma a incluir questões que pudessem incidir sobre possíveis fatores de risco associados à infeção por estes agentes, já que a transmissão ocorre através de flebótomos e mosquitos, respetivamente, e, portanto, existem outras variáveis a considerar. Estas novas questões foram, posteriormente, acrescentadas e, para tal, foram realizadas chamadas telefónicas a todos os tutores dos cães amostrados de forma a registar as respostas. Também pelo facto destes agentes patogénicos, sobretudo *L. Infantum*, terem sido acrescentados numa fase em que já tinha sido concluído o período de colheita de amostras, não foi realizada outra análise laboratorial específica e adequada à sua deteção, além da sorologia.

Embora a inclusão de animais vacinados contra *B. canis* e *L. infantum* num estudo de fatores de risco associados à seroprevalência destes mesmos agentes possa, de facto, influenciar os resultados, foi considerada a sua inclusão, uma vez que foram encontrados, também, animais negativos na análise sorológica que estavam vacinados. Em estudos futuros, seria pertinente registar a data da última vacinação para tentar perceber qual a verdadeira duração de anticorpos conferida pela vacina, além de estimar prevalências sem a influência deste possível fator limitante.

6. Conclusão

Os objetivos iniciais propostos para o presente estudo foram atingidos, tendo sido obtido um panorama atual da prevalência de agentes transmitidos por vetores na região interior norte do Alentejo, região onde escasseavam dados sobre esta temática. Simultaneamente, este estudo contribuiu, também, para um melhor conhecimento do panorama de prevalência nacional dos mesmos agentes.

Os resultados obtidos vieram comprovar a hipótese inicial: a zona interior norte do Alentejo tem características favoráveis ao estabelecimento de uma população ativa de vetores e agentes transmitidos por estes. Considerando que os animais incluídos na amostra não apresentavam manifestações clínicas, as seroprevalências obtidas para *E. canis* (22,9%), *B. canis* (26,5%) e *L. infantum* (33,7%) são valores considerados significativos. Destaca-se a seroprevalência de *B. canis*, agente que se considera mais prevalente no norte do país; este estudo vem demonstrar que a sua prevalência a sul do país não deve ser negligenciada. Surpreendentemente, a seroprevalência de *D. immitis* (0,98%) foi mínima. Pelas características da região e estilo de vida dos animais incluídos na amostra seria, talvez, esperada uma maior incidência deste agente. No entanto, estima-se que outros fatores (proximidade dos locais de habitação dos cães às pedreiras, utilização de produtos repelentes/inseticidas nas pedreiras) não inquiridos no presente estudo possam ter, de facto, influência na prevalência deste agente na região, devendo estes ser considerados em estudos futuros. Mais expectável, registou-se o valor de 0% de seroprevalência de *A. phagocytophilum*, talvez explicado pelo facto do vetor deste agente ser mais frequente nos países do norte e centro da Europa.

Embora estes valores de seroprevalência indiquem apenas que o animal teve contacto com o agente, não significando, necessariamente, infeção ativa, o presente estudo sugere a endemicidade de *E. canis*, *B. canis* e *L. infantum* na região. Seria interessante avaliar em estudos futuros, com recurso a métodos moleculares, a presença de DNA destes agentes nestes animais, confirmando, assim, a sua condição de hospedeiro reservatório e atestando o risco que representam para a saúde de outros animais e, pelo seu carácter zoonótico, para a saúde do Homem. Outro aspeto interessante de considerar e registar em futuros estudos seria o histórico de viagens de cada animal, dentro e fora do país, para atestar que são, de facto, infeções autóctones.

Em todo o caso e, salvaguardando as limitações do estudo, os resultados obtidos demonstram que os médicos veterinários devem considerar esta problemática, alertando os tutores para a necessidade do cumprimento de uma profilaxia multimodal, rastreios periódicos e tratamento de animais infetados, consciencializando-os que esta é uma problemática de saúde pública que coloca em risco, também, a saúde do Homem.

Bibliografia

- American Heartworm Society. 2018. Current Canine Guidelines for the Prevention , Diagnosis , and Management of Heartworm (Dirofilaria immitis) Infection in Dogs.
- Alvarado-Rybak M, Solano-Gallego L, Millán J. 2016. A review of piroplasmid infections in wild carnivores worldwide: importance for domestic animal health and wildlife conservation. *Parasite & Vectors*. 9(1):538. doi:10.1186/s13071-016-1808-7. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1808-7>.
- André MR. 2018. Diversity of Anaplasma and Ehrlichia/Neoehrlichia Agents in Terrestrial Wild Carnivores Worldwide: Implications for Human and Domestic Animal Health and Wildlife Conservation. *Frontiers in Veterinary Science*. 5(November). doi:10.3389/fvets.2018.00293. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2018.00293/full>.
- Araújo AM. 1996. Canine and human Dirofilaria immitis infections in Portugal. A review. *Parassitologia*, editor.
- Asfaram S, Fakhar M, Teshnizi SH. 2019. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 25(May):1–10. doi:10.1590/1678-9199-jvatitd-2019-0012. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992019000100204&tlng=en.
- Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, Fox P, Gordon S, Haggstrom J, Hamlin R, Keene B, Luis-Fuentes V, Stepien R. 2009. Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Canine Chronic Valvular Heart Disease. *J Vet Intern Med*. 23(6):1142–1150. doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0392.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12041661%5Cnhttp://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1939-1676.2002.tb02374.x/asset/j.1939-1676.2002.tb02374.x.pdf?v=1&t=ijeioymg&s=aaa7c9e3c908d7bcb6461ab46906583a987ad443>.
- Baneth G. 2018. Antiprotozoal treatment of canine babesiosis. *Veterinary Parasitology*. 254(2010):58–63. doi:10.1016/j.vetpar.2018.03.001. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.001>.
- Baneth G, Bourdeau P, Bourdoiseau G, Bowman D, Breitschwerdt E, Capelli G, Cardoso L, Dantas-Torres F, Day M, Dedet J-P, et al. 2012. Vector-Borne Diseases - constant challenge for practicing veterinarians: recommendations from the CVBD World Forum. *Parasite & Vectors*. 5(1):55. doi:10.1186/1756-3305-5-55.
- Beugnet F, Marié J-L. 2009. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. *Veterinary Parasitology*. 163(4):298–305. doi:10.1016/j.vetpar.2009.03.028. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401709001733>.
- Borin S, Crivelenti LZ, Ferreira FA. 2009. Aspectos epidemiológicos, clínicos e hematológicos de 251 cães portadores de mórula de Ehrlichia spp. naturalmente infectados. *Arq Bras Med Veterinária e Zootec*. 61(3):566–571. doi:10.1590/S0102-09352009000300007. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352009000300007&lng=pt&tlng=pt.
- Bowman DD, Drake J. 2017. Examination of the “susceptibility gap” in the treatment of canine heartworm infection. *Parasite & Vectors*. 10(S2):513. doi:10.1186/s13071-017-2433-9. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2433-9>.
- Brown LD, Cai TT, DasGupta A. 2001. Interval Estimation for a Binomial Proportion Author (s): Lawrence D . Brown , T . Tony Cai , Anirban DasGupta Published by : Institute of Mathematical Statistics Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2676784>. Stat Sci. 16(2):101–117. <http://jstor.org/stable/2676784>.

- Campino L, Maia C. 2010. Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. *Acta Médica Portuguesa* 23(5):859–864. doi:10.20344/amp.715.
- Capelli G, Genchi C, Baneth G, Bourdeau P, Brianti E, Cardoso L, Danesi P, Fuehrer H-P, Giannelli A, Ionică AM, et al. 2018. Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasite & Vectors*. 11(1):663. doi:10.1186/s13071-018-3205-x. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-3205-x>.
- Cardoso L, Gilad M, Cortes H, Nachum-Biala Y, Lopes A, Vila-Viçosa M, Simões M, Rodrigues PA, Baneth G. 2015. First report of *Anaplasma platys* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) and molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania infantum* in foxes from Portugal. *Parasite & Vectors*. 8(1):144. doi:10.1186/s13071-015-0756-y. <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/144>.
- Cardoso L, Mendão C, Madeira de Carvalho L. 2012. Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma* spp. and *Leishmania infantum* in apparently healthy and CVBD-suspect dogs in Portugal - a national serological study. *Parasite & Vectors*. 5(1):62. doi:10.1186/1756-3305-5-62. <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-62>.
- Carretón E, Morchón R, Montoya-Alonso JA. 2017. Cardiopulmonary and inflammatory biomarkers in heartworm disease. *Parasite & Vectors*. 10(S2):534. doi:10.1186/s13071-017-2448-2. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2448-2>.
- Centeno-Lima S, do Rosario V, Parreira R, Maia AJ, Freudenthal AM, Nijhof AM, Jongejan F. 2003. A fatal case of human babesiosis in Portugal: molecular and phylogenetic analysis. *Tropical Medicine and International Health*. 8(8):760–764. doi:10.1046/j.1365-3156.2003.01074.x. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3156.2003.01074.x>.
- Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac. 2019. REVIVE 2018 - Culicídeos e Ixodídeos : Rede de Vigilância de Vetores. :60. file:///C:/Users/asus/Downloads/Relatorio-REVIVE_2017.pdf.
- Centro de Informação Geoespacial do Exército. 2013. Cartografia. [accessed 2019 Oct 15]. <https://www.igeoe.pt/index.php?id=186&p=1&distrito=7&escala=1&extracto=458>.
- Checa R, Fidalgo LE, Montoya A, López AM, Barrera JP, Gálvez R, Sánchez de la Nieta S, Marino V, Sarquis J, Miró G. 2019. The role of healthy dog carriers of *Babesia microti*-like piroplasms. *Parasite & Vectors*. 12(1):127. doi:10.1186/s13071-019-3371-5. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3371-5>.
- Cohn LA. 2003. Ehrlichiosis and related infections. *Vet Clin North Small Anim* 33(4):863–884. doi:10.1016/S0195-5616(03)00031-7. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561603000317>.
- Dantas-Torres F, Miró G, Bowman DD, Gradoni L, Otranto D. 2019. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. *Trends in Parasitology*. 35(2):97–101. doi:10.1016/j.pt.2018.11.005. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.005>.
- Dantas-Torres F, Otranto D. 2016. Best Practices for Preventing Vector-Borne Diseases in Dogs and Humans. *Trends in Parasitology*. 32(1):43–55. doi:10.1016/j.pt.2015.09.004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.09.004>.
- Day MJ. 2011. One health: the importance of companion animal vector-borne diseases. *Parasite & Vectors*. 4(1):49. doi:10.1186/1756-3305-4-49. <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-4-49>.
- Direção Geral do Território. 2018. Carta Administrativa Oficial de Portugal - Versão 2018.

- Dixon-Jimenez AC, Coleman AE, Rapoport GS, Creevy KE, Roth I, Correa M, Moorhead AR. 2018. Approaches to Canine Heartworm Disease Treatment Among Alumni of a Single College of Veterinary Medicine. *J American Animal Hospital Association*. 54(5):246–256. doi:10.5326/JAAHA-MS-6601. <http://jaaha.org/doi/10.5326/JAAHA-MS-6601>.
- Duthie MS, Lison A, Courtenay O. 2018. Advances toward Diagnostic Tools for Managing Zoonotic Visceral Leishmaniasis. *Trends in Parasitology*. 34(10):881–890. doi:10.1016/j.pt.2018.07.012. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.07.012>.
- ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control.
- Esch KJ, Petersen CA. 2013. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. *Clinical Microbiology Reviews* 26(1):58–85. doi:10.1128/CMR.00067-12. <http://cmr.asm.org/lookup/doi/10.1128/CMR.00067-12>.
- Fernández Cotrina J, Iniesta V, Monroy I, Baz V, Hugnet C, Marañón F, Fabra M, Gómez-Nieto LC, Alonso C. 2018. A large-scale field randomized trial demonstrates safety and efficacy of the vaccine LetiFend® against canine leishmaniosis. *Vaccine*. 36(15):1972–1982. doi:10.1016/j.vaccine.2018.02.111. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X18303219>.
- Ferreira A, Alho AM, Otero D, Gomes L, Nijse R, Overgaauw PAM, Madeira De Carvalho L. 2017. Urban Dog Parks as Sources of Canine Parasites: Contamination Rates and Pet Owner Behaviours in Lisbon, Portugal. *J Environ Public Health*. 2017. doi:10.1155/2017/5984086.
- Fourie JJ, de Vos C, Crafford D, Pollmeier M, Schunack B. 2019. A study on the long-term efficacy of Seresto® collars in preventing *Babesia canis* (Piana & Galli-Valerio, 1895) transmission to dogs by infected *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794) ticks. *Parasite & Vectors*. 12(1):139. doi:10.1186/s13071-019-3393-z. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3393-z>.
- Gálvez R, Montoya A, Fontal F, Martínez De Murguía L, Miró G. 2018. Controlling phlebotomine sand flies to prevent canine *Leishmania infantum* infection: A case of knowing your enemy. *Research in Veterinary Science*. 121(October):94–103. doi:10.1016/j.rvsc.2018.10.008. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.10.008>.
- Genchi C, Kramer L. 2017. Subcutaneous dirofilariosis (*Dirofilaria repens*): an infection spreading throughout the old world. *Parasite & Vectors*. 10(S2):517. doi:10.1186/s13071-017-2434-8. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2434-8>.
- Genchi C, Rinaldi L, Cascone C, Mortarino M, Cringoli G. 2005. Is heartworm disease really spreading in Europe? *Veterinary Parasitology*. 133(2–3):137–148. doi:10.1016/j.vetpar.2005.04.009. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030440170500141X>.
- Geurden T, Becskei C, Six RH, Maeder S, Latrofa MS, Otranto D, Farkas R. 2018. Detection of tick-borne pathogens in ticks from dogs and cats in different European countries. *Ticks Tick Borne Diseases*. 9(6):1431–1436. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.06.013. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.013>.
- GfK (GfK track.2pets). 2016. Portugal tem 6,7 milhões de animais de estimação. *Veterinária atual*.
- Gonçalves AAM, Leite JC, Resende LA, Mariano RM da S, Silveira P, Melo-Júnior OA de O, Ribeiro HS, de Oliveira DS, Soares DF, Santos TAP, et al. 2019. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 9(December). doi:10.3389/fcimb.2019.00427.

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2019.00427/full>.

Harrus S. 2015. Perspectives on the pathogenesis and treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *The Veterinary Journal*. 204(3):239–240. doi:10.1016/j.tvjl.2015.04.027. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.04.027>.

Iborra S, Solana JC, Requena JM, Soto M. 2018. Vaccine candidates against leishmania under current research. *Expert Review of Vaccines*. 17(4):323–334. doi:10.1080/14760584.2018.1459191. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1459191>.

ICNF. 2018. Calendário Venatório Época Venatória 2018-2019. (5):2019. <http://www2.icnf.pt/portal/caca/cv-dc/resource/doc/calendario-venatorio-2018-2019v3.pdf>.

Instituto Nacional de Estatística IP. 2012. Censos 2011 Resultados Definitivos - Região Alentejo.

IPMA. 2017. Clima de Portugal Continental. [accessed 2019 Oct 8] <http://www.ipma.pt/pt/educativa/tempo.clima/index.jsp?page=clima.pt.xml>.

IPMA. 2018. Boletim climatológico mensal. [accessed 2019 Oct 8]. <http://www.ipma.pt/pt/publicacoes/boletins.jsp?cmbDep=cli&cmbTema=pcl&cmbAno=2018&dDep=cli&idTema=pcl&curAno=2018>.

Jahfari S, Coipan E, Fonville M, van Leeuwen A, Hengeveld P, Heylen D, Heyman P, van Maanen C, Butler CM, Földvári G, et al. 2014. Circulation of four *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in Europe. *Parasite & Vectors*. 7(1):365. doi:10.1186/1756-3305-7-365. <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-365>.

Landis, J., Koch G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159-174. doi:10.2307/2529310

Little S, Saleh M, Wohltjen M, Nagamori Y. 2018. Prime detection of *Dirofilaria immitis*: understanding the influence of blocked antigen on heartworm test performance. *Parasite & Vectors*. 11(1):186. doi:10.1186/s13071-018-2736-5. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2736-5>.

Little SE. 2010. Ehrlichiosis and Anaplasmosis in Dogs and Cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 40(6):1121–1140. doi:10.1016/j.cvsm.2010.07.004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.004>.

Low VL, Prakash BK, Lim YA-L, Tan TK, Vinnie-Siow WY, Sofian-Azirun M, AbuBakar S. 2018. Detection of Anaplasmataceae agents and co-infection with other tick-borne protozoa in dogs and *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ticks. *Exp Appl Acarol*. 75(4):429–435. doi:10.1007/s10493-018-0280-9. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0280-9>.

M.A. Taylor RLC and RLW. 2016. Veterinary parasitology. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080601800186>.

Maia C, Almeida B, Coimbra M, Fernandes M, Cristóvão J, Ramos C, Martins Â, Martinho F, Silva P, Neves N, et al. 2015. Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors*. 8(1):138. doi:10.1186/s13071-015-0759-8. <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/138>.

Maia C, Campino L. 2018. Biomarkers Associated With *Leishmania infantum* Exposure, Infection, and Disease in Dogs. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 8(September):1–18. doi:10.3389/fcimb.2018.00302. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2018.00302/full>.

Maia C, Coimbra M, Ramos C, Cristóvão JM, Cardoso L, Campino L. 2015. Serological

- investigation of *Leishmania infantum*, *Dirofilaria immitis* and *Angiostrongylus vasorum* in dogs from southern Portugal. *Parasites & Vectors* :1–4. doi:10.1186/s13071-015-0771-z.
- Maia C, Lorentz S, Cardoso L, Otranto D, Naucke TJ. 2015. Detection of *Dirofilaria repens* microfilariae in a dog from Portugal. *Parasitology Research*. 115(1):441–443. doi:10.1007/s00436-015-4796-1. <http://link.springer.com/10.1007/s00436-015-4796-1>.
- Matijatko V, Torti M, Schetters TP. 2012. Canine babesiosis in Europe: how many diseases? *Trends in Parasitology*. 28(3):99–105. doi:10.1016/j.pt.2011.11.003. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.11.003>.
- McCall JW, Guerrero J, Genchi C, Kramer L. 2004. Recent advances in heartworm disease. *Veterinary Parasitology*. 125(1–2):105–130. doi:10.1016/j.vetpar.2004.05.008. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401704001992>.
- Mehlhorn H. 2011. Progress in Parasitology. p. ii. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864758000137>.
- Meireles J, Paulos F, Serrão I. 2014. *Dirofilariose canina e felina*. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*. 109:591–592.
- Menn B, Lorentz S, Naucke TJ. 2010. Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasite & Vectors*, 3, 34. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-34>
- Mierzejewska E, Dwużnik D, Bajer A. 2018. Molecular study of transovarial transmission of *Babesia canis* in the *Dermacentor reticulatus* tick. *Ann Agric Environ Med*. 25(4):669–671. doi:10.26444/aaem/94673. <http://www.journalssystem.com/aaem/The-molecular-study-of-transovarial-transmission-of-Babesia-canis-in-the-Dermacentor,94673,0,2.html>.
- Mihalca AD, Cazan CD, Sulesco T, Dumitrache MO. 2019. A historical review on vector distribution and epidemiology of human and animal leishmanioses in Eastern Europe. *Research in Veterinary Science*. 123:185–191. doi:10.1016/j.rvsc.2019.01.018. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.018>.
- Millán J, Proboste T, Fernández de Mera IG, Chirife AD, de la Fuente J, Altet L. 2016. Molecular detection of vector-borne pathogens in wild and domestic carnivores and their ticks at the human–wildlife interface. *Ticks Tick Borne Dis*. 7(2):284–290. doi:10.1016/j.ttbdis.2015.11.003. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.11.003>.
- Miró G, López-Vélez R. 2018. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. *Veterinary Parasitology*. 254(March):151–159. doi:10.1016/j.vetpar.2018.03.002. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.002>.
- Moreno J. 2019. Assessment of Vaccine-Induced Immunity Against Canine Visceral Leishmaniasis. *Frontiers in Veterinary Science*. 6(June):1–10. doi:10.3389/fvets.2019.00168. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2019.00168/full>.
- Nathaly Wieser S, Schnittger L, Florin-Christensen M, Delbecq S, Schetters T. 2019. Vaccination against babesiosis using recombinant GPI-anchored proteins. *Int J Parasitol*. 49(2):175–181. doi:10.1016/j.ijpara.2018.12.002. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.12.002>.
- Nelson CT. 2015. Principles of Treatment Canine Heartworm Disease. *Today's Vet Pract*. (April):53–59. tvjournal.com.
- Nelson CT, Myrick ES, Nelson TA. 2017. Clinical benefits of incorporating doxycycline into a canine heartworm treatment protocol. *Parasite & Vectors*. 10(S2):515. doi:10.1186/s13071-017-2446-4. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2446-4>.

- Oliveira CS, Ratzlaff FR, Pötter L, Romão PRT, Botton S de A, Vogel FSF, Sangioni LA. 2019. Clinical and Pathological Aspects of Canine Cutaneous Leishmaniasis: A Meta-analysis. *Acta Parasitol.*(0123456789). doi:10.2478/s11686-019-00063-7. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00063-7>.
- Palacios M, Arteaga R, Calvo G. 2017. High-Dose Filgrastim Treatment of Nonregenerative Pancytopenia Associated With Chronic Canine Ehrlichiosis. *Top Companion Anim Med.* 32(1):28–30. doi:10.1053/j.tcam.2017.05.005. <http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2017.05.005>.
- Pennisi MG, Persichetti MF. 2018. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? *Veterinary Parasitology.* 251(December 2017):131–137. doi:10.1016/j.vetpar.2018.01.012. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401718300190>.
- Pereira A, Parreira R, Cotão AJ, Nunes M, Vieira ML, Azevedo F, Campino L, Maia C. 2018. Tick-borne bacteria and protozoa detected in ticks collected from domestic animals and wildlife in central and southern Portugal. *Ticks Tick Borne Dis.* 9(2):225–234. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.09.008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.09.008>.
- Pineda C, Aguilera-tejero E, Morales MC, Belinchon- S, Gomez-nieto LC, Garcia P, Martinez-moreno JM, Lopez I. 2017. Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. :1–17.
- René M, Chêne J, Beauvils JP, Valiente Moro C, Bourdoiseau G, Mavingui P, Chabanne L. 2012. First evidence and molecular characterization of *Babesia vogeli* in naturally infected dogs and *Rhipicephalus sanguineus* ticks in southern France. *Veterinary Parasitology.* 187(3–4):399–407. doi:10.1016/j.vetpar.2012.01.030. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.030>.
- Ribeiro RR, Michalick MSM, da Silva ME, dos Santos CCP, Frézard FJG, da Silva SM. 2018. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *Biomed Res Int.* 2018(CI):1–12. doi:10.1155/2018/3296893. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/3296893/>.
- Rogan, W.; Gladen B. 1978. Estimating prevalence from the results of a screening test. *American journal of epidemiology*, 107(1), 71-76. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112510>
- Sainz Á, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L. 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasite& Vectors.* 8(1):75. doi:10.1186/s13071-015-0649-0. <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/75>.
- Sanches GS, Couto J, Silva-Pedrosa R, Ferrolho J, Santos AS, Santos-Silva MM, Antunes S, Domingos A. 2018. Molecular heterogeneity of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and screening for *Ehrlichia canis* in mainland Portugal. *Ticks Tick Borne Dis.* 9(6):1383–1390. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.06.002. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.06.002>.
- Santos AS, Alexandre N, Sousa R, Nuncio MS, Bacellar F, Dumler JS. 2009. Serological and molecular survey of *Anaplasma* species infection in dogs with suspected tickborne disease in Portugal. *Vet Rec.* 164(6):168–171. doi:10.1136/vr.164.6.168. <http://veterinaryrecord.bmj.com/cgi/doi/10.1136/vr.164.6.168>.
- Santos AS, de Bruin A, Veloso AR, Marques C, Pereira da Fonseca I, de Sousa R, Sprong H, Santos-Silva MM. 2018. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Candidatus Neoehrlichia sp.*, *Coxiella burnetii* and *Rickettsia spp.* in questing ticks from a recreational park, Portugal. *Ticks Tick Borne Dis.* 9(6):1555–1564. doi:10.1016/j.ttbdis.2018.07.010. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.07.010>.
- Santos ASP. 2007. *Anaplasma phagocytophilum* and human granulocytic anaplasmosis in

Portugal. Dissertação de doutoramento em Ciências Biomédicas. Lisboa: Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa

Schäfer I, Volkmann M, Beelitz P, Merle R, Müller E, Kohn B. 2019. Retrospective evaluation of vector-borne infections in dogs imported from the Mediterranean region and southeastern Europe (2007–2015). *Parasite & Vectors*. 12(1):30. doi:10.1186/s13071-018-3284-8. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-3284-8>.

Schettters T. 2005. Vaccination against canine babesiosis. *Trends in Parasitology*. 21(4):179–184. doi:10.1016/j.pt.2005.02.006. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492205000462>.

Skotarczak B. 2018. The role of companion animals in the environmental circulation of tick-borne bacterial pathogens. *Ann Agric Environ Med*. 25(3):473–480. doi:10.26444/aaem/93381. <http://www.journalssystem.com/aaem/The-role-of-companion-animals-in-the-environmental-circulation-of-tick-borne-bacterial,93381,0,2.html>.

Smith B. 2012. The 'pet effect'—health related aspects of companion animal ownership. *Aust Fam Physician*. 41(6):439–42. doi:10.1007/978-3-642-34724-5. <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-34724-5>.

Solano-Gallego L, Baneth G. 2011. Babesiosis in dogs and cats—Expanding parasitological and clinical spectra. *Veterinary Parasitology*. 181(1):48–60. doi:10.1016/j.vetpar.2011.04.023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.023>.

Solano-Gallego L, Sainz Á, Roura X, Estrada-Peña A, Miró G. 2016. A review of canine babesiosis: the European perspective. *Parasite & Vectors*. 9(1):336. doi:10.1186/s13071-016-1596-0. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1596-0>.

Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. 2013. Anaplasma phagocytophilum—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3(July):1–33. doi:10.3389/fcimb.2013.00031. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fcimb.2013.00031/abstract>.

Takashima G, Day M. 2014. Setting the One Health Agenda and the Human–Companion Animal Bond. *International Journal Environmental Research and Public Health*. 11(11):11110–11120. doi:10.3390/ijerph111111110. <http://www.mdpi.com/1660-4601/11/11/11110>.

Takashima GK, Day MJ. 2014. Setting the one health Agenda and the human-companion animal bond. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11(11):11110–11120. doi:10.3390/ijerph111111110.

Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F, Miró G. 2018. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. Büscher P, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 12(1):e0006082. doi:10.1371/journal.pntd.0006082. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006082>.

Wikel S. 2018. Ticks and Tick-Borne Infections: Complex Ecology, Agents, and Host Interactions. *Vet Sci*. 5(2):60. doi:10.3390/vetsci5020060. <http://www.mdpi.com/2306-7381/5/2/60>.

Zajac AM, Conboy GA. 2012. *Veterinary Clinical Parasitology*. 8th edition. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell. <http://ir.obihiro.ac.jp/dspace/handle/10322/3933>.

Zinsstag J, Crump L, Schelling E, Hattendorf J, Maidane YO, Ali KO, Muhummed A, Umer AA, Aliyi F, Nooh F, et al. 2018. Climate change and One Health. *FEMS Microbiol Lett*. 365(11):1–9. doi:10.1093/femsle/fny085. <https://academic.oup.com/femsle/article/doi/10.1093/femsle/fny085/4961133>.

Anexos

Anexo 1 – Protocolo de tratamento da dirofilariose canina, recomendado pela American Heartworm Society (fonte: <https://www.heartwormsociety.org/veterinary-resources/american-heartworm-society-guidelines>)

Dia	Tratamento
Dia 0	<p>Cão diagnosticado positivo para dirofilariose.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Positivo no teste de antígeno (Ag) e teste de microfilária (Mf) circulantes • Se não foi observada presença de microfilária circulante, repetir o teste de antígeno (Ag) circulante, com diferente teste diagnóstico <p>Restrição aos exercícios</p> <ul style="list-style-type: none"> • Quanto mais severos os sintomas, maior a restrição <p>Se o cão for sintomático:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Estabilizar a doença com a terapia e cuidados adequados • Prednisona pode ser prescrita na dose de 0.5 mg/kg BID na primeira semana, 0.5 mg/kg SID na segunda semana, 0.5 mg/kg EOD na terceira e quarta semanas
Dia 1	<p>Administrar terapêutica preventiva (lactona macrocíclica)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se forem detectadas microfilárias circulantes, instituir um pré-tratamento com antihistaminico e glicocorticoesteriode, se já não tiver aplicado prednisona, para reduzir o risco de anafilaxia • Observar por pelo menos 8 horas para verificar se há reação adversa
Dia 1–28	<p>Administrar doxiciclina 10 mg/kg BID por 4 semanas.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Reduz a patologia associada aos nematoides mortos • Interrompe a transmissão da dirofilariose
Dia 30	Administrar terapêutica preventiva (lactona macrocíclica)
Dia 60	<p>Administrar terapêutica preventiva (lactona macrocíclica)</p> <p>Primeira aplicação de melarsomina 2.5 mg/kg (IM)</p> <p>Prescrever prednisona 0.5 mg/kg BID na primeira semana, 0.5 mg/kg SID na segunda semana, 0.5 mg/kg EOD na terceira e quarta semanas.</p> <p>Diminuir o nível de atividade física ainda mais</p> <ul style="list-style-type: none"> • Restringir o espaço do animal ou, quando no quintal, utilizar a coleira para evitar exercícios
Dia 90	<p>Administrar terapêutica preventiva (lactona macrocíclica)</p> <p>Segunda aplicação de melarsomina 2.5 mg/kg (IM)</p>
Dia 91	<p>Terceira aplicação de melarsomina 2.5 mg/kg (IM)</p> <p>Prescrever prednisona 0.5 mg/kg BID na primeira semana, 0.5 mg/kg SID na segunda semana, 0.5 mg/kg EOD na terceira e quarta semanas</p> <p>Continuar a restrição de exercícios físicos por mais 6-8 semanas após a injeção de melarsomina</p>
Dia 120	<p>Pesquisa de microfilárias circulantes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se positivo, tratamento com microfilaricida e refazer o teste após 4 semanas • Estabelecer prevenção contra dirofilariose durante o ano todo.
Dia 271	Teste de antígeno (Ag) circulante seis meses após o fim do tratamento e teste para microfilárias.

Anexo 2 – Inquérito, desenvolvido pela autora, realizado aos tutores dos animais incluídos no estudo (frente)



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



Fatores de risco associados à Febre da Carraça

Inquérito realizado no âmbito de um projeto de investigação que visa a conclusão do mestrado integrado em Medicina Veterinária

Data da Colheita:

Dados do Animal

Nome:

Espécie:

Raça:

Sexo: M / F

Idade:

Morada do animal:

Nome do Tutor:

Características e hábitos do animal:

Qual a aptidão do animal? Companhia ____ Caça ____ Guarda ____ Outra ____

Há quanto tempo está com o tutor?

Proveniência do animal: Loja ____ Criador ____ Canil ____ Rua ____ Oferecido por particular ____

Tem acesso ao exterior? Sim ____ Não ____

Se sim, indicar se é permanente ou intermitente (riscar o que não interessa)

Frequenta espaços públicos (passeios)? Sim ____ Não ____

Se sim, indicar se o faz à trela ou solto? (riscar o que não interessa)

Os passeios são em ambiente rural ou urbano? (riscar o que não interessa)

Quantas vezes por dia?

Duração de cada passeio?

Contacto com outros animais? Sim ____ Não ____

Se sim, indique quais:

Algum diagnosticado com Febre da Carraça (no passado ou presentemente)?

Faz proteção contra carraças? Sim ____ Não ____

Se sim, qual o produto que utiliza:

Data da sua última aplicação:

Anexo 3 – Inquérito, desenvolvido pela autora, realizado aos tutores dos animais incluídos no estudo (verso)

Faz vacina contra a Babesiose Canina? Sim ____ Não ____
Se sim, completou a primovacinação? Sim ____ Não ____
Faz os reforços anuais? Sim ____ Não ____
Alguma vez teve história de Febre da Carrapa? Sim ____ Não ____
Se sim, quando?
Fez tratamento? Sim ____ Não ____
O animal recuperou clinicamente? Sim ____ Não ____
Teve recaídas? Sim ____ Não ____
Tem historial de doença dermatológica anteriormente?
Se sim, qual? Quando?

Exame físico:

Comprimento do pêlo:

Presença de carrapas: Sim ____ Não ____

Se sim, assinale as localizações na imagem ao lado.

Freq. Cardíaca:

Freq. Respiratória:

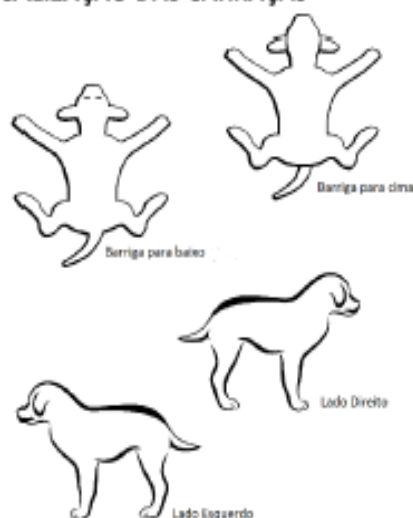
TRC:

Cor das mucosas:

Temperatura retal:

Condição física (0 – 5):

LOCALIZAÇÃO DAS CARRAÇAS



Ao abrigo do Regulamento Geral de Proteção de Dados (RGPD), em vigor desde 25 de Maio de 2018, declaro que autorizo o tratamento dos dados recolhidos no presente inquérito de forma confidencial e, apenas, para a realização do estudo em questão,

Anexo 4 – Distribuição da seroprevalência de *A. phagocytophilum* por fator de risco

A. PHAGOCYTOPHILUM				
	Positivo	Duvidoso	Negativo	p
Idade				
Jovem	0 (0%)	0 (0%)	10 (100%)	0,6
Adulto	0 (0%)	2 (2,6%)	76 (97,4%)	
Sênior	0 (0%)	1 (7,1%)	13 (92,9%)	
Raça				
Definida	0 (0%)	1 (1,5%)	66 (98,5%)	0,3
Indefinida	0 (0%)	2 (5,7%)	33 (94,3%)	
Sexo				
M	0 (0%)	2 (4,3%)	45 (95,7%)	0,6
F	0 (0%)	1 (1,8%)	54 (98,2%)	
Comprimento do pêlo				
Comprido	0 (0%)	1 (3,2%)	30 (96,8%)	1
Curto	0 (0%)	2 (2,8%)	69 (97,2%)	
Aptidão				
Companhia	0 (0%)	2 (3,8%)	51 (96,2%)	1
Criação	0 (0%)	1 (4,3%)	22 (95,7%)	
Caça	0 (0%)	0 (0%)	8 (100%)	
Guarda	0 (0%)	0 (0%)	18 (100%)	
Proveniência				
Criador	0 (0%)	1 (2,5%)	39 (97,5%)	1
Nascido em casa (pais do mesmo tutor)	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	
Oferecido por particular	0 (0%)	1 (2,7%)	36 (97,3%)	
Rua	0 (0%)	1 (4,5%)	21 (95,5%)	
Acesso ao exterior				
Intermitente	0 (0%)	2 (3,7%)	52 (96,3%)	1
Permanente	0 (0%)	1 (2,1%)	47 (97,9%)	
Exposição a ambiente rural				
Sim	0 (0%)	3 (3,1%)	93 (96,9%)	1
Não	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)	

Contacto com outros animais

Sim	0 (0%)	3 (3,1%)	95 (96,9%)	1
Não	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)	

Contacto com cães

Sim	0 (0%)	3 (3,2%)	90 (96,8%)	1
Não	0 (0%)	0 (0%)	9 (100%)	

Contacto com gatos

Sim	0 (0%)	0 (0%)	33 (100%)	0,6
Não	0 (0%)	3 (4,3%)	66 (95,7%)	

Contacto com cavalos

Sim	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3%)	96 (97%)	

Contacto com bovinos

Sim	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3,1%)	95 (96,9%)	

Contacto com ovinos

Sim	0 (0%)	0 (0%)	12 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3,3%)	87 (96,7%)	

Contacto com suínos

Sim	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3%)	97 (97%)	

Contacto com caprinos

Sim	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3,2%)	92 (96,8%)	

Contacto com aves de capoeira

Sim	0 (0%)	1 (3,2%)	30 (96,8%)	1
Não	0 (0%)	2 (2,8%)	69 (97,2%)	

Contacto com coelhos

Sim	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3%)	98 (97%)	

Contacto com caça

Sim	0 (0%)	0 (0%)	2 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3%)	97 (97%)	

Contacto com animais com diagnóstico de hemoparasitas

Sim	0 (0%)	1 (5,9%)	16 (94,1%)	0,4
Não	0 (0%)	2 (2,4%)	83 (97,6%)	

Proteção contra artrópodes

Sim	0 (0%)	3 (3,2%)	91 (96,8%)	1
Não	0 (0%)	0 (0%) ⁴	8 (100%)	

Regularidade da utilização do produto

Regular	0 (0%)	0 (0%)	22 (100%)	1
Irregular	0 (0%)	3 (4,2%)	69 (95,8%)	

Diagnóstico anterior de hemoparasitas

Sim	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3%)	98 (97%)	

Historial doença dermatológica

Sim	0 (0%)	1 (6,2)	15 (93,8%)	0,4
Não	0 (0%)	2 (2,3%)	84 (97,7%)	

Presença de artrópodes no exame físico

Sim	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3,1%)	93 (96,9%)	

Proteção contra mosquitos/flebótomos

Sim	0 (0%)	1 (1,6%)	63 (98,4%)	0,6
Não	0 (0%)	2 (5,3%)	36 (64,7%)	

Regularidade da utilização do produto

Sim	0 (0%)	0 (0%)	20 (100%)	1
Não	0 (0%)	1 (2,2%)	44 (97,8%)	

Pernoita em ambiente interior

Sim	0 (0%)	3 (4,5%)	63 (95,5%)	0,6
Não	0 (0%)	0 (0%)	36 (100%)	

A morada do animal é ventosa

Sim	0 (0%)	1 (2%)	48 (98%)	1
Não	0 (0%)	2 (3,8%)	51 (96,2%)	

Utilização de Bravecto®

Sim	0 (0%)	2 (4%)	48 (96%)	0,6
Não	0 (0%)	1 (1,9%)	51 (98,1%)	

Utilização de Vectra®

Sim	0 (0%)	0 (0%)	19 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3,6%)	80 (96,4%)	

Utilização de Advantix®

Sim	0 (0%)	1 (10%)	9 (90,0%)	0,3
Não	0 (0%)	2 (2,2%)	90 (97,8%)	

Utilização de Scalibor®

Sim	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3,1%)	93 (96,9%)	

Utilização de Seresto®

Sim	0 (0%)	0 (0%)	32 (100%)	0,5
Não	0 (0%)	3 (4,3%)	67 (95,7%)	

Utilização de Eliminal®

Sim	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3%)	98 (97%)	

Utilização de Piretron®

Sim	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3%)	98 (97%)	

Utilização de Frontline®

Sim	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3%)	98 (97%)	

Utilização de Taktic®

Sim	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	0 (0%)	3 (3%)	98 (97%)	

Anexo 5 – Distribuição da seroprevalência de *E. canis* por fator de risco

E. CANIS			
	Positivo	Negativo	p
Idade			
Jovem	0 (0%)	10 (100%)	0,0004
Adulto	15 (19,2%)	63 (80,8%)	
Sênior	9 (64,3%)	5 (35,7%)	
Raça			
Definida	8 (11,9%)	59 (88,1%)	0,0001
Indefinida	16 (45,7%)	19 (54,3%)	
Sexo			
M	13 (27,7%)	34 (72,3%)	0,4
F	11 (20%)	44 (80%)	
Comprimento do pêlo			
Comprido	8 (25,8%)	23 (74,2%)	0,7
Curto	16 (22,5%)	55 (77,5%)	
Aptidão			
Companhia	17 (32,1%)	36 (67,9%)	0,1
Criação	2 (8,7%)	21 (91,3%)	
Caça	2 (25%)	6 (75%)	
Guarda	3 (16,7%)	15 (83,3%)	
Proveniência			
Criador	8 (20%)	32 (80%)	0,4
Nasceu em casa (pais do mesmo tutor)	0 (0%)	3 (100%)	
Oferecido por particular	8 (21,6%)	29 (78,4%)	
Rua	8 (36,4%)	14 (63,6%)	
Acesso ao exterior			
Intermitente	8 (14,8%)	46 (85,2%)	0,03
Permanente	16 (33,3%)	32 (66,7%)	
Exposição a ambiente rural			
Sim	23 (24%)	73 (76%)	1
Não	1 (16,7%)	5 (83,3%)	

Contacto com outros animais

Sim	23 (23,5%)	75 (76,5%)	1
Não	1 (25%)	3 (75%)	

Contacto com cães

Sim	22 (23,7%)	71 (76,3%)	1
Não	2 (22,2%)	7 (77,8%)	

Contacto com gatos

Sim	7 (21,2%)	26 (78,8%)	0,7
Não	17 (24,6%)	52 (75,4%)	

Contacto com cavalos

Sim	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,6
Não	23 (23,2%)	76 (76,8%)	

Contacto com bovinos

Sim	0 (0%)	4 (100%)	0,6
Não	24 (24,5%)	74 (75,5%)	

Contacto com ovinos

Sim	3 (25%)	9 (75%)	1
Não	21 (23,3%)	69 (76,7%)	

Contacto com suínos

Sim	0 (0%)	2 (100%)	1
Não	24 (24%)	76 (76%)	

Contacto com caprinos

Sim	0 (0%)	7 (100%)	0,2
Não	24 (25,3%)	71 (74,7%)	

Contacto com aves de capoeira

Sim	10 (32,3%)	21 (67,7%)	0,2
Não	14 (19,7%)	57 (80,3%)	

Contacto com coelhos

Sim	1 (100%)	0 (0%)	0,2
Não	23 (22,8%)	78 (77,2%)	

Contacto com caça

Sim	0 (0%)	2 (100%)	1
Não	24 (24%)	76 (76%)	

Contacto com animais com diagnóstico de hemoparasitas			
Sim	9 (52,9%)	8 (47,1%)	0,004
Não	15 (17,6%)	70 (82,4%)	
Proteção contra artrópodes			
Sim	23 (24,5%)	71 (75,5%)	0,7
Não	1 (12,5%)	7 (87,5%)	
Regularidade da utilização do produto			
Regular	4 (18,2%)	18 (81,8%)	0,4
Irregular	19 (26,4%)	53 (73,6%)	
Diagnóstico anterior de hemoparasitas			
Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	24 (23,8%)	77 (76,2%)	
Historial doença dermatológica			
Sim	7 (43,8%)	9 (56,2%)	0,05
Não	17 (19,8%)	69 (80,2%)	
Presença de artrópodes no exame físico			
Sim	1 (16,7%)	5 (83,3%)	1
Não	23 (24%)	73 (76%)	
Proteção contra mosquitos/flebótomos			
Sim	13 (20%)	52 (80%)	0,3
Não	11 (29,7%)	26 (70,3%)	
Regularidade da utilização do produto			
Sim	4 (20%)	16 (80%)	1
Não	9 (20%)	36 (80%)	
Pernoita em ambiente interior			
Sim	15 (22,7%)	51 (77,3%)	0,8
Não	9 (25%)	27 (75%)	
A morada do animal é ventosa			
Sim	12 (24,5%)	37 (75,5%)	0,8
Não	12 (22,6%)	41 (77,4%)	

Utilização de Bravecto®

Sim	14 (28%)	36 (72%)	0,3
Não	10 (19,2%)	42 (80,8%)	

Utilização de Vectra®

Sim	4 (20%)	16 (80%)	0,8
Não	20 (24,4%)	62 (75,6%)	

Utilização de Advantix®

Sim	4 (40%)	6 (60%)	0,2
Não	20 (21,7%)	72 (78,3%)	

Utilização de Scalibor®

Sim	2 (33,3%)	4 (66,7%)	0,6
Não	22 (22,9%)	74 (77,1%)	

Utilização de Seresto®

Sim	3 (9,4%)	29 (90,6%)	0,02
Não	21 (30%)	49 (70%)	

Utilização de Eliminal®

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	24 (23,8%)	77 (76,2%)	

Utilização de Piretron®

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	24 (23,8%)	77 (76,2%)	

Utilização de Frontline®

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	24 (23,8%)	77 (76,2%)	

Utilização de Taktic® (banhos)

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	24 (23,8%)	77 (76,2%)	

Anexo 6 – Distribuição da seroprevalência de *Babesia canis* por fator de risco

BABESIA CANIS			
	Positivo	Negativo	p
Idade			
Jovem	2 (20%)	8 (80%)	0,03
Adulto	17 (21,8%)	61 (78,2%)	
Sênior	8 (57,1%)	6 (42,9%)	
Raça			
Definida	14 (20,9%)	53 (79,1%)	0,07
Indefinida	13 (37,1%)	22 (62,9%)	
Sexo			
M	14 (29,8%)	33 (70,2%)	0,5
F	13 (23,6%)	42 (76,4%)	
Comprimento do pêlo			
Comprido	7 (22,6%)	24 (77,4%)	0,6
Curto	20 (28,2%)	51 (71,8%)	
Aptidão			
Companhia	15 (28,3%)	38 (71,7%)	0,3
Criação	8 (34,8%)	15 (65,2%)	
Caça	0 (0%)	8 (100%)	
Guarda	4 (22,2%)	14 (77,8%)	
Proveniência			
Criador	11 (27,5%)	29 (72,5%)	0,5
Nasceu em casa (pais do mesmo tutor)	0 (0%)	3 (100%)	
Oferecido por particular	8 (21,6%)	29 (78,4%)	
Rua	8 (36,4%)	14 (63,6%)	
Acesso ao exterior			
Intermitente	16 (29,6%)	38 (70,4%)	0,4
Permanente	11 (22,9%)	37 (77,1%)	
Exposição a ambiente rural			
Sim	26 (27,1%)	70 (72,9%)	1
Não	1 (16,7%)	5 (83,3%)	

Contacto com outros animais

Sim	26 (26,5%)	72 (73,5%)	1
Não	1 (25%)	3 (75%)	

Contacto com cães

Sim	25 (26,9%)	68 (73,1%)	1
Não	2 (22,2%)	7 (77,8%)	

Contacto com gatos

Sim	6 (18,2%)	27 (81,8%)	0,2
Não	21 (30,4%)	48 (69,6%)	

Contacto com cavalos

Sim	1 (33,3%)	2 (66,7%)	1
Não	26 (26,3%)	73 (73,7%)	

Contacto com bovinos

Sim	0 (0%)	4 (100%)	0,6
Não	27 (27,6%)	71 (72,4%)	

Contacto com ovinos

Sim	3 (25%)	9 (75%)	1
Não	24 (26,7%)	66 (73,3%)	

Contacto com suínos

Sim	0 (0%)	2 (100%)	1
Não	27 (27%)	73 (73%)	

Contacto com caprinos

Sim	0 (0%)	7 (100%)	0,2
Não	27 (28,4%)	68 (71,6%)	

Contacto com aves de capoeira

Sim	8 (25,8%)	23 (74,2%)	0,9
Não	19 (26,8%)	51 (73,2%)	

Contacto com coelhos

Sim	1 (100%)	0 (0%)	0,3
Não	26 (25,7%)	75 (74,3%)	

Contacto com caça

Sim	0 (0%)	2 (100%)	1
Não	27 (27%)	73 (73%)	

Contacto com animais com diagnóstico de hemoparasitas

Sim	4 (23,5%)	13 (76,5%)	1
Não	23 (27,1%)	62 (72,9%)	

Proteção contra artrópodes

Sim	25 (26,6%)	69 (73,4%)	1
Não	2 (25%)	6 (75%)	

Regularidade da utilização do produto

Regular	4 (18,2%)	18 (81,8%)	0,3
Irregular	21 (29,2%)	51 (70,8%)	

Diagnóstico anterior de hemoparasitas

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	27 (26,7%)	74 (73,3%)	

Historial doença dermatológica

Sim	6 (37,5%)	10 (62,5%)	0,4
Não	21 (24,4%)	65 (75,6%)	

Presença de artrópodes no exame físico

Sim	0 (0%)	6 (100%)	0,3
Não	27 (28,1%)	69 (71,9%)	

Vacinação contra a babesiose canina

Sim	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,2
Não	25 (25,3%)	74 (74,7%)	

Proteção contra mosquitos/flebótomos

Sim	15 (23,4%)	49 (76,6%)	0,4
Não	12 (31,6%)	26 (68,4%)	

Regularidade da utilização do produto

Sim	5 (25%)	15 (75%)	1
Não	10 (22,2%)	35 (77,8%)	

Pernoita em ambiente interior

Sim	20 (30,3%)	46 (69,7%)	0,2
Não	7 (19,4%)	29 (80,6%)	

A morada do animal é ventosa

Sim	13 (26,5%)	36 (73,5%)	1
Não	14 (26,4%)	39 (73,6%)	

Utilização de Bravecto®

Sim	13 (26%)	37 (73,1%)	0,9
Não	14 (26,9%)	38 (72,7%)	

Utilização de Vectra®

Sim	4 (21,1%)	15 (78,9%)	0,6
Não	23 (27,7%)	60 (72,3%)	

Utilização de Advantix®

Sim	3 (30%)	7 (70%)	0,7
Não	24 (26,1%)	68 (73,9%)	

Utilização de Scalibor®

Sim	1 (16,7%)	5 (83,3%)	1
Não	26 (27,1%)	70 (72,9%)	

Utilização de Seresto®

Sim	6 (18,8%)	26 (81,2%)	0,2
Não	21 (30%)	49 (70%)	

Utilização de Eliminal®

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	27 (26,7%)	74 (73,3%)	

Utilização de Piretron®

Sim	1 (100%)	0 (0%)	1
Não	26 (25,7%)	75 (74,3%)	

Utilização de Frontline®

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	27 (26,7%)	74 (73,3%)	

Utilização de Taktic® (banhos)

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	27 (26,7%)	74 (73,3%)	

Anexo 7 – Distribuição da seroprevalência de *L. infantum* por fator de risco

L. INFANTUM			
	Positivo	Negativo	p
Idade			
Jovem	0 (0%)	10 (100%)	0,02
Adulto	28 (35,9%)	50 (64,1%)	
Sênior	7 (50%)	7 (50%)	
Raça			
Definida	23 (34,3%)	44 (65,7%)	0,999
Indefinida	12 (34,3%)	23 (65,7%)	
Sexo			
M	18 (38,3%)	29 (61,7%)	0,4
F	17 (30,9%)	38 (69,1%)	
Comprimento do pêlo			
Comprido	9 (29%)	22 (71%)	0,5
Curto	26 (36,6%)	45 (63,4%)	
Aptidão			
Companhia	15 (28,3%)	38 (71,7%)	0,04
Criação	10 (43,5%)	13 (56,5%)	
Caça	6 (75%)	2 (25%)	
Guarda	4 (22,2%)	14 (77,8%)	
Proveniência			
Criador	17 (42,5%)	23 (57,5%)	0,6
Nasceu em Casa (pais do mesmo tutor)	1 (33,3%)	2 (66,7%)	
Oferecido por particular	11 (29,7%)	26 (70,3%)	
Rua	6 (27,3%)	16 (72,7%)	
Acesso ao exterior			
Intermitente	14 (25,9%)	40 (74,1%)	0,06
Permanente	21 (43,8%)	27 (56,2%)	
Exposição a ambiente rural			
Sim	35 (36,5%)	61 (63,5%)	0,09
Não	0 (0%)	6 (100%)	

Contacto com outros animais

Sim	34 (34,7%)	64 (65,3%)	1
Não	1 (25%)	3 (75%)	

Contacto com cães

Sim	33 (35,5%)	60 (64,5%)	0,7
Não	2 (22,2%)	7 (77,8%)	

Contacto com gatos

Sim	10 (30,3%)	23 (69,7%)	0,6
Não	25 (36,2%)	44 (63,8%)	

Contacto com cavalos

Sim	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,3
Não	33 (33,3%)	66 (66,7%)	

Contacto com bovinos

Sim	1 (25%)	3 (75%)	1
Não	34 (34,7%)	64 (65,3%)	

Contacto com ovinos

Sim	4 (33,3%)	8 (66,7%)	1
Não	31 (34,8%)	59 (65,6%)	

Contacto com suínos

Sim	0 (0%)	2 (100%)	0,5
Não	35 (35%)	65 (65%)	

Contacto com caprinos

Sim	2 (28,6%)	5 (71,4%)	1
Não	33 (34,7%)	62 (65,3%)	

Contacto com aves de capoeira

Sim	11 (35,5%)	20 (64,5%)	0,9
Não	24 (33,8%)	47 (66,2%)	

Contacto com coelhos

Sim	1 (100%)	0 (0%)	0,3
Não	34 (33,7%)	67 (66,3%)	

Contacto com caça

Sim	2 (100%)	0 (0%)	0,1
Não	33 (33%)	67 (67%)	

Proteção contra artrópodes

Sim	35 (37,2%)	59 (62,8%)	0,05
Não	0 (0%)	8 (100%)	

Regularidade de utilização do produto

Regular	6 (27,3%)	16 (72,7%)	0,3
Irregular	29 (40,3%)	43 (59,7%)	

Historial doença dermatológica

Sim	7 (43,8%)	9 (56,2%)	0,4
Não	28 (32,6%)	58 (67,4%)	

Proteção contra mosquitos/flebótomos

Sim	27 (42,2%)	37 (57,8%)	0,02
Não	8 (21,1%)	30 (78,9%)	

Regularidade de utilização do produto

Sim	6 (30%)	14 (70%)	0,2
Não	21 (46,7%)	24 (53,3%)	

Pernoita em ambiente interior

Sim	20 (30,3%)	46 (69,7%)	0,3
Não	15 (41,7%)	21 (58,3%)	

A morada do animal é ventosa

Sim	19 (38,8%)	30 (61,2%)	0,4
Não	16 (30,2%)	37 (69,8%)	

Presença de mosquitos/flebótomos na área da habitação

Sim	10 (28,6%)	25 (71,4%)	0,4
Não	25 (37,3%)	42 (62,7%)	

Utilização de Bravecto®

Sim	18 (36%)	32 (64%)	0,7
Não	17 (32,7%)	35 (67,3%)	

Utilização de Vectra®

Sim	10 (50%)	10 (50%)	0,1
Não	25 (30,5%)	57 (69,5%)	

Utilização de Advantix®

Sim	1 (10%)	9 (90%)	0,2
Não	34 (37%)	58 (63%)	

Utilização de Scalibor®

Sim	2 (33,3%)	4 (66,7%)	1
Não	33 (34,4%)	63 (65,6%)	

Utilização de Seresto®

Sim	16 (50%)	16 (50%)	0,02
Não	19 (27,1%)	51 (72,9%)	

Utilização de Eliminal®

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	35 (34,7%)	66 (65,3%)	

Utilização de Piretron®

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	35 (34,7%)	66 (65,3%)	

Utilização de Frontline®

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	35 (34,7%)	66 (65,3%)	

Utilização de Taktic® (banhos)

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	35 (34,7%)	66 (65,3%)	

Vacinação contra a leishmaniose canina

Sim	10 (55,6%)	8 (44,4%)	0,04
Não	25 (29,8%)	59 (70,2%)	

Vacinação com Canileish®

Sim	10 (62,5%)	6 (37,2%)	0,01
Não	25 (29,1%)	61 (70,9%)	

Vacinação com Letifend®

Sim	0 (0%)	2 (100%)	0,5
Não	35 (35%)	65 (65%)	

Anexo 8 – Distribuição da seroprevalência de *D. immitis* por fator de risco

D. IMMITIS			
	Positivo	Negativo	p
Idade			
Jovem	0 (0%)	10 (100%)	1
Adulto	1 (1,3%)	77 (98,7%)	
Sênior	0 (0%)	14 (100)	
Raça			
Definida	1 (1,5%)	66 (100%)	1
Indefinida	0 (0%)	35 (98,5%)	
Sexo			
M	0 (0%)	47 (100%)	1
F	1 (1,8%)	54 (98,2%)	
Comprimento do pêlo			
Comprido	0 (0%)	31 (100%)	1
Curto	1 (1,4%)	70 (98,6%)	
Aptidão			
Companhia	0 (0%)	53 (100%)	0,3
Criação	0 (0%)	23 (100%)	
Caça	0 (0%)	8 (100%)	
Guarda	1 (5,6%)	17 (94,4%)	
Proveniência			
Criador	0 (0%)	40 (100%)	0,3
Nasceu em casa (pais do mesmo tutor)	0 (0%)	3 (100%)	
Oferecido por particular	0 (0%)	37 (100%)	
Rua	1 (95,5%)	21 (95,5%)	
Acesso ao exterior			
Intermitente	0 (0%)	54 (100%)	0,5
Permanente	1 (2,1%)	47 (97,9%)	
Exposição a ambiente rural			
Sim	1 (1%)	95 (99%)	1
Não	0 (0%)	6 (100%)	

Contacto com outros animais

Sim	1 (1%)	97 (99%)	1
Não	0 (0%)	4 (100%)	

Contacto com cães

Sim	1 (1,1%)	92 (98,9%)	1
Não	0 (0%)	9 (100%)	

Contacto com gatos

Sim	0 (0%)	33 (100%)	1
Não	1 (1,4%)	68 (98,6%)	

Contacto com cavalos

Sim	0 (0%)	3 (100%)	1
Não	1 (1%)	98 (99%)	

Contacto com bovinos

Sim	0 (0%)	4 (100%)	1
Não	1 (1%)	97 (99%)	

Contacto com ovinos

Sim	1 (8,3%)	11 (91,7%)	0,1
Não	0 (0%)	90 (100%)	

Contacto com suínos

Sim	1 (50%)	1 (50%)	0,02
Não	0 (0%)	100 (100%)	

Contacto com caprinos

Sim	1 (14,3%)	6 (85,7%)	0,07
Não	0 (0%)	95 (100%)	

Contacto com aves de capoeira

Sim	1 (3,2%)	30 (96,8%)	0,3
Não	0 (0%)	71 (100%)	

Contacto com coelhos

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	1 (1%)	100 (99%)	

Contacto com caça

Sim	0 (0%)	2 (100%)	1
Não	1 (1%)	99 (99%)	

Proteção contra artrópodes

Sim	1 (1,1%)	93 (98,9%)	1
Não	0 (0%)	8 (100%)	

Regularidade da utilização do produto

Regular	0 (0%)	22 (100%)	1
Irregular	1 (1,4%)	71 (98,6%)	

Historial doença dermatológica

Sim	0 (0%)	16 (100%)	1
Não	1 (1,2%)	85 (98,8%)	

Proteção contra mosquitos/flebótomos

Sim	0 (0%)	64 (100%)	0,4
Não	1 (2,6%)	37 (97,4%)	

Regularidade da utilização do produto

Regular	0 (0%)	20 (100%)	1
Irregular	1 (2,2%)	44 (97,8%)	

Pernoita em ambiente interior

Sim	0 (0%)	66 (100%)	0,4
Não	1 (2,8%)	35 (97,2%)	

A morada do animal é ventosa

Sim	1 (2%)	48 (98%)	0,5
Não	0 (0%)	53 (100%)	

Presença de mosquitos/flebótomos na área de habitação

Sim	1 (2,9%)	34 (97,1%)	0,3
Não	0 (0%)	67 (100%)	

Utilização de Bravecto®

Sim	0 (0%)	50 (100%)	1
Não	1 (2,3%)	51 (97,7%)	

Utilização de Vectra®

Sim	0 (0%)	19 (100%)	1
Não	1 (1,2%)	82 (98,8%)	

Utilização de Advantix®

Sim	0 (0%)	10 (100%)	1
Não	1 (1,1%)	91 (98,9%)	

Utilização de Scalibor®

Sim	1 (16,7%)	5 (83,3%)	0,1
Não	0 (0%)	96 (100%)	

Utilização de Seresto®

Sim	0 (0%)	32 (100%)	1
Não	1 (1,4%)	69 (98,6%)	

Utilização de Eliminal®

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	1 (1%)	100 (99%)	

Utilização de Piretron®

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	1 (1%)	100 (99%)	

Utilização de Frontline®

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	1 (1%)	100 (99%)	

Utilização de Taktic® (banhos)

Sim	0 (0%)	1 (100%)	1
Não	1 (1%)	100 (99%)	